



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 2 (mayo – agosto), es una publicación electrónica cuatrimestral editada por la Universidad de Sonora, a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo electrónico: 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)



Tabla de contenido - número actual

XXV(2), mayo - agosto, 2023

Review Articles

Enterobacterias en Carne de Cerdo: Agentes Causales de Problemas de Salud Pública

Enterobacterias en Carne de Cerdo

AD Paz-Gonzalez, K Vázquez, AV Martínez-Vázquez, C Ramírez-Martínez, G Rivera

pp 73 - 78

Mecanismos asociados con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica

Modificación del endospermo en maíz

D Gonzalez-Nuñez, KV Pineda-Hidalgo, N Salazar-Salas, JA López-Valenzuela

pp 79 - 89

Modificaciones químicas de galactomananos: síntesis y análisis estructura-función

Modificaciones químicas de galactomananos

GH Gómez-Rodríguez, J Lizardi-Mendoza, W Argüelles-Monal, O Álvarez-Bajo, YL López-Franco

pp 126 - 135

Original Articles

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 2. Dinámica de mineralización del carbono y nitrógeno

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero

LL Acosta Sotelo, JF Zamora Natera, R Rodríguez Macías, C Jiménez Plascencia, JF Gallardo Lancho, E Salcedo Perez

pp 5 - 11

Propiedades fisicoquímicas y digestibilidad in vitro de almidones resistentes obtenidos por autoclaveado y lintnerización a partir de almidones nativos de maíz, manzana y malanga

Propiedades fisicoquímicas y digestibilidad de almidones resistentes

V Aguilar-Mendoza, PB Zamudio Flores, FJ Molina-Corral, GI Olivas-Orozco, G Vela-Gutiérrez, M Hernández-González,

HY López-De la Peña, A Ortega-Ortega, R Salgado-Delgado, V Espinosa-Solis

pp 12 - 22

Efecto de las condiciones de procesamiento sobre las propiedades funcionales de la aquafaba de garbanzos naturales: valorización de un residuo alimentario

Propiedades funcionales de la aquafaba de garbanzos naturales

A Thomas-Meda, G Vela-Gutierrez, OL Tavano, VG Tacias-Pascacio

pp 23 - 29

Efecto de la adición de almidón resistente tipo 3 de avena en las propiedades viscoelásticas de la masa y su influencia sobre la calidad de galletas

Almidón resistente tipo 3 de avena

JG Monter-Miranda, PB Zamudio Flores, M Espino-Díaz, JM Tirado-Gallegos, JR Rendón-Villalobos, F Hernández-Centeno,

M Hernández-González, HY López-De la Peña, G Vela-Gutiérrez, R Salgado-Delgado, A Ortega-Ortega

pp 30 - 43

Composición nutricional en granos de triticales (X. Triticosecale Wittmack) y usos alimentarios

Composición nutricional de triticales alimenticios

A García-Ramírez, G Rodríguez-Pérez, FJ Reynaga-Franco, JF Cervantes-Ortiz

pp 44 - 51

Cascarilla de arroz fragmentada como componente del medio de crecimiento de plántulas de albahaca

Cascarilla de arroz en crecimiento de albahaca

E Cruz-Crespo, A Can-Chulim, W Chan-Cupul, G Luna-Esquivel, AN Rojas-Velazquez, OR Mancilla-Villa

pp 52 - 59

Caracterización fisicoquímica de almidón recuperado de papa (Solanum tuberosum) residual de la industria de papas fritas en México

Caracterización fisicoquímica de almidón recuperado de papa

DG Montoya-Anaya, TJ Madera-Santana, CL Aguirre-Mancilla, CP Grijalva-Verdugo, G Gonzáles-García, CA Núñez-Colín,

JR Rodríguez-Nuñez

pp 60 - 72

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 1. Dinámica de degradación

Dinámica de degradación de Bagazo y composta

LL Acosta-Sotelo, JF Zamora-Natera, R Rodríguez-Macías, DR González-Eguiarte, JF Gallardo-Lancho, E Salcedo-Pérez

pp 90 - 96

Rendimiento y composición química de Panicum maximum cv. Tanzania en un sistema silvopastoril en Chiapas

Panicum maximum cv. Tanzania en un sistema silvopastoril

E Pérez-Luna, B Ruiz-Sesma, Y Sánchez-Roque, MA Canseco-Pérez, YC Pérez Luna

pp 97 - 104

Inactivación de <i>Staphylococcus aureus</i> y mantenimiento del valor nutricional de la leche humana por altas presiones hidrostáticas y secado por aspersión	
Inactivación de <i>Staphylococcus aureus</i> y mantenimiento del valor nutricional de la leche humana	
BR Aguilar-Uscanga, M Calderón-Santoyo, M Iñiguez-Moreno, JR Solís-Pacheco, A Fonseca-Cantabrana, JA Ragazzo-Sanchez	pp 105 - 112
Inducción de cambios de tamaño, color y en cutícula en bayas de uva de mesa por medio de bioreguladores	
Cambios en bayas de uvas de mesa	
LC González-García, A Sánchez-Estrada, JN Mercado-Ruiz, R Báez-Sañudo, A González-León	pp 113 - 119
Caracterización de la ganadería caprina en una localidad de la Reserva de Biosfera Tehuacán-Cuicatlán	
Vegetación y ganadería caprina en Tehuacán-Cuicatlán	
J Manzano-Duran, L García-Feria, S Mandujano-Rodríguez	pp 120 - 125
Efecto de iones y concentración de proteína Ps19, una proteína de la concha de <i>Pteria sterna</i>, en los polimorfos de carbonato de calcio	
Polimorfos de carbonato de calcio en Concha Nácar	
R Arroyo-Loranca, C Rivera, L Hernández Adame, AA Cruz Villacorta, JL Rodríguez López, NY Hernández Saavedra	pp 136 - 145
Un método simple de solución para preparar precursores de VO₂:Co₂+ para la deposición de película delgada mediante el método de procesamiento en solución	
Un método simple de solución para preparar películas delgadas de VO ₂ :Co ₂ +	
F Hernandez-Guzman, G Suarez Campos, D Cabrera-German, MA Milan-Franco, H Hu, MA Quevedo-Lopez, M Sotelo-Lerma	pp 146 - 152
Actividad antifúngica del aceite esencial y extracto acuoso del orégano <i>Lippia palmeri</i> W. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Thana-tephorus</i> sp	
Actividad antifúngica del orégano <i>Lippia palmeri</i> W.	
G VALENZUELA-QUINTERO, MM ORTEGA-NIEBLAS, MG BURBOA, LE GUTIÉRREZ-MILLÁN, JP LÓPEZ-CÓRDOVA, ME RENTERIA-MARTINEZ, J JIMENEZ-LEON, G CURLANGO-RIVERA, JC GUERRERO-RUIZ	pp 153 - 158
Crecimiento y rendimiento de sandía injertada en suelo infestado con <i>Meloidogyne incognita</i> (Tylenchida: Heteroderidae)	
Control biorracional de nematodos fitoparásitos en hortalizas	
CI Basto-Pool, V Reyes-Oregel, E Herrera-Parra, JM Tun-Suarez, J Cristóbal-Alejo	pp 159 - 164
Péptido antimicrobiano AP7121: inhibición de adhesión bacteriana en catéteres vasculares	
Péptido antimicrobiano AP7121 en catéteres	
S Lissarrague, L Schofs, M Bistoletti, L García Allende, A Lallée, B Baldaccini, S Sánchez Bruni, M Sparo	pp 165 - 168
Rendimiento de semilla del guar en función del distanciamiento entre surcos y densidad de población	
Rendimiento de semilla del guar	
DG Reta-Sánchez, JI Sánchez-Duarte, E Ochoa Martínez, A Reyes González	pp 169 - 175
Estabilidad dinámica de miembros inferiores en basquetbolistas con y sin discapacidad auditiva según protocolo de McGill y Test de la Y	
Estabilidad dinámica de miembros inferiores en basquetbolistas	
Olga Lucía Hincapié Gallón, LM Tierradentro Gómez, Daniela Bravo Romero, Nathalia Córdoba Peña	pp 176 - 180
Análisis bibliométrico de la literatura científica sobre el abono orgánico Bokashi: alternativa en la agricultura sostenible	
Abono orgánico Bokashi: en la agricultura sostenible	
Gabriela González-Rodríguez, Pablo Preciado-Rangel, Christian Guadalupe Lizárraga-Bernal, Bernardo Espinosa-Palomeque	pp 181 - 193
Caracterización morfo – cultural y variabilidad genética y molecular de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	
Variabilidad de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	
D Ynfante Martínez, B Martínez-Coca, B Peteira-Delgado, Y Reyes-Duque, K Gil, J Simpson, A Herrera-Estrella	pp 194 - 203
Análisis sensorial, textural y actividad antioxidante de queso añejo de Zacazonapan durante la maduración	
Análisis del queso añejo de Zapopan	
V Torres-Salas, A Hernández-Montes, BE Hernández-Rodríguez	pp 204 - 213

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 2. Dinámica de mineralización del carbono y nitrógeno

Bagasse and compost of tequila agave bagasse in contrasting soils: 2. Dynamics of carbon and nitrogen mineralization

Laura Liliana Acosta Sotelo¹, Juan Francisco Zamora Natera², Ramón Rodríguez Macías², Cecilia Jiménez Plascencia², Juan Fernando Gallardo Lancho³ y Eduardo Salcedo Pérez^{2*}

¹ Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BEMARENA), Universidad de Guadalajara, Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, 45200 Zapopan (Jalisco, México).
 laura.acosta1798@alumnos.udg.mx (0000-0002-7263-7110).

² Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara. Carretera a Nogales, km 15,5, Predio Las Agujas, Zapopan (Jalisco, México).
 juan.znatera@academicos.udg.mx, (0000-0002-8550-4616); ramon.rmacias@academicos.udg.mx, (0000-0003-0857-6699);
 cecilia.jplascencia@academicos.udg.mx; eduardo.salcedo@academicos.udg.mx, (0000-0002-5292-3099),

³ C.S.I.C., IRNAsa (jubilado). Salamanca 37008 (España). juanf.gallardo@gmail.com (0000-0002-4174-3930).

RESUMEN

El estudio del proceso de mineralización de bagazos y compostas de bagazo (subproductos procedentes de la elaboración del tequila) permite predecir los efectos que tendrán sobre la fertilidad del suelo al ser incorporados al mismo. El objetivo del estudio fue evaluar el proceso de mineralización del carbono orgánico remanente (COR); nitrógeno remanente (NR); y relación carbono/nitrógeno (C/N), de cuatro materiales Bagazo autoclave (BA), Bagazo difusor (BD), composta de bagazo autoclave (CBA) y Composta de bagazo difusor (CBD), en suelos contrastantes (regosol y luvisol), por el método de las bolsas de descomposición. Después de un año de evaluación las variables mostraron diferencias significativas entre los residuos orgánicos (RO); y suelos. Se encontró que la cantidad absoluta de COR disminuyó gradualmente en los bagazos a lo largo del año, mientras que la cantidad de NR no disminuyó de manera significativa, por lo que se observó una evidente reducción de la relación C/N. Estas variables en las compostas permanecieron parcialmente estables durante el proceso de mineralización. Por lo tanto, ambos materiales se pueden añadir al suelo, aunque con objetivos diferentes; en el caso de las compostas se pueden incorporar en el suelo, mientras que en el caso de los bagazos conviene sólo depositarlos sobre el suelo.

Palabras claves: Regosoles, luvisoles, subproductos orgánicos, composición química.

ABSTRACT

The study of the mineralization process of bagasse and bagasse compost (by-products from the production of tequila) allows predicting their effects on soil fertility upon their incorporation. The objective of the study was to evaluate the mineralization process of the remaining organic carbon (COR), N remaining nitrogen (NR) and Carbon/nitrogen ratio (C/N), in four materials autoclave bagasse (BA), diffuser bagasse (BD), autoclaved bagasse compost (CBA), and diffuser bagasse compost (CBD), in contrasting soils (regosol and luvisol), by the decomposition bag method. After one year of evaluation, the variables showed significant differences between organic waste (OR) and soils. It was found that the absolute amount of COR gradually decreased in the bagasse throughout the year, while the amount of NR did not decrease significantly, so, an evident C/N ratio reduction was observed. These variables in the composts remained partially stable during the mineralization process. Therefore, both materials can be added to the soil, but with different objectives; in the case of compost, they can be incorporated into the soil, while in the case of bagasse it is only advisable to deposit them over soil surface.

gasse (BD), autoclaved bagasse compost (CBA), and diffuser bagasse compost (CBD), in contrasting soils (regosol and luvisol), by the decomposition bag method. After one year of evaluation, the variables showed significant differences between organic waste (OR) and soils. It was found that the absolute amount of COR gradually decreased in the bagasse throughout the year, while the amount of NR did not decrease significantly, so, an evident C/N ratio reduction was observed. These variables in the composts remained partially stable during the mineralization process. Therefore, both materials can be added to the soil, but with different objectives; in the case of compost, they can be incorporated into the soil, while in the case of bagasse it is only advisable to deposit them over soil surface.

Keywords: Regosols, luvisols, organic by-products, chemical composition.

INTRODUCCIÓN

Aunque se conoce el papel que puede ejercer los residuos orgánicos (RO) sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, Bonilla *et al.* (2020) señalaron que para hacer un manejo adecuado de los RO es necesario conocer cómo se presenta el proceso de descomposición, así como de la dinámica de mineralización después de su incorporación al suelo. El ritmo de descomposición de RO en términos de pérdida de su biomasa, así como la dinámica de mineralización de C y N, han sido estudiadas en diferentes sistemas agrícolas con resultados variables. Dichas variaciones han sido atribuidas al origen y calidad del RO, tamaño de partícula de este, tiempo de incubación en el suelo, humedad edáfica, entre otras (González *et al.*, 2008). Los RO con mayor atención son los obtenidos de la producción de granos y cereales (Pérez *et al.*, 2010; Aranda, 2013); sin embargo, existen otros generados por la industria de bebidas y alimentos que no han sido estudiados en profundidad. Dentro de

*Autor para correspondencia: Eduardo Salcedo Pérez
 Correo-e: eduardo.salcedo@academicos.udg.mx

Recibido: 12 de Julio de 2022

Aceptado: 17 de noviembre de 2022

estos materiales se pueden mencionar los RO generados en la industria del tequila. En el Estado de Jalisco el *Agave tequilana* Weber var. *Azul* es considerado el cultivo de mayor importancia económica. De acuerdo con López *et al.* (2010) la continua y creciente demanda del tequila a nivel nacional e internacional da lugar a la generación de altos volúmenes de RO sólidos como el bagazo (subproducto compuesto por fibras lignocelulósicas de diferente longitud), generado de la extracción de azúcares fermentables de un tallo sin hojas. De acuerdo con el Consejo Regulador de Tequila (CRT, 2020) se produjeron 374,000,000 L de esta bebida lo que derivó en 562,800 ton de bagazo. Ante la problemática ambiental y económica que ocasiona la disposición de estos RO para la industria tequilera la mayor parte de ellos, son incinerados. Lo anterior ha generado alternativas para convertir esta biomasa en biocombustible, alimento para animales o papel, entre otros. En el ámbito agrícola estos RO, en forma de compostas o vermicompostas, son utilizados como sustrato para la germinación de diferentes especies vegetales (Iñiguez *et al.*, 2011; Crespo *et al.*, 2013). Por otro lado, es común que algunos agricultores incorporen estos RO al suelo de forma directa o indirecta (composta), lo cual es congruente con lo reportado por Turiján *et al.* (2012), quienes señalaron que las prácticas agrícolas modernas incluyen la devolución de los RO de los cultivos al suelo. Lamentablemente hasta la fecha no se tiene información sobre la dinámica de mineralización de C y N en los suelos que, generalmente, reciben estos materiales como enmienda orgánica. Por todo lo anterior se realizó un experimento con el objetivo de evaluar, durante un año, la dinámica de mineralización del C y N del bagazo de agave en suelos agrícolas del estado de Jalisco (México).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de la investigación

La investigación fue realizada desde el 1° de julio del 2019 al 1° de julio del 2020 en el Centro Universitario de Ciencia

Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, *Campus* de Zapopan, (Jalisco, México; coordenadas 20°43' N y 103°23' W); se trata de una extensa llanura situada a una altitud de 1.550 m.s.n.m., la temperatura media anual es de 19,4 °C y precipitación media anual de 957 mm.

Suelos y subproductos orgánicos seleccionados

Se utilizaron dos tipos de bagazo de agave; uno proveniente de la cocción en autoclave, molienda y prensado denominado bagazo de autoclave (BA) y el otro, mediante difusión de agua caliente llamado bagazo de difusor (BD). Así mismo, estos bagazos fueron utilizados en forma de compostas: composta bagazo de autoclave (CBA) y composta de bagazo del difusor (CBD), siendo elaboradas de acuerdo, a los procedimientos recomendados por (Iñiguez *et al.*, 2011). Las características químicas de los materiales se presentan en el Tabla 1. Se dispuso de un diseño completamente al azar con arreglo factorial (4 x 2 x 7), con tres repeticiones, donde los factores fueron (4 materiales orgánicos) (2 tipo de suelo) y (7 momentos de muestreo). Para ambos suelos se prepararon un total de 168 bolsas de nylon (marca Ankom), 5 cm de ancho x 10 de largo y 1 mm de abertura de malla, en cada bolsa se colocaron 5 g en base seca de cada uno de los RO en estudio. Se establecieron un total de 14 cubetas de plástico, 7 cubetas para cada tipo de suelo; en cada cubeta se colocaron tres bolsas de descomposición a 10 cm de profundidad. Se recuperaron las bolsas a los 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 365 d. En cada muestreo se recuperaron tres bolsas por tratamiento, las cuales se limpiaron eliminando las partículas de suelo. El residuo recuperado se colocó en estufa de aire forzado a 70 °C durante 48 h; se retiró el residuo de la estufa y se pesó en una balanza analítica Hanchen®.

Por otra parte, se utilizaron dos suelos contrastantes: Regosol, suelo poco evolucionado; y 2) Luvisol crómico, suelo muy evolucionado; de acuerdo a la tipificación de la FAO (WRB, 2015); las características químicas y físicas se midieron de acuerdo a la NOM 021 RECNAT (2000); Tabla 2.

Tabla 1. Caracterización química inicial de los residuos orgánicos empleados.

Table 1. Initial chemical characterization of the organic waste used.

	Concentración inicial (mg g ⁻¹)					
	Carbono	Nitrógeno	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Relación C/N
BA	41,2	0,52	40,4	10,0	10,0	79,0
BD	40,9	0,56	33,0	9,1	6,5	74,0
CBA	23,3	1,28	26,3	7,1	11,1	18,3
CBD	24,0	1,85	23,5	8,1	11,6	12,8

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los suelos empleados en este estudio.

Table 2. Physical and chemical properties of the soils used in this study.

Suelo	Partículas minerales			Textura	MOS	D _{ap}	pH
	(%)						
	Arena	Limo	Arcilla	(%)	(Mg m ⁻³)	(agua)	
Regosol	59,8	26,0	14,2	Franco arenosa	1,39	1,09	5,1
Luvisol	33,8	36,0	30,2	Franco limosa	1,26	0,97	6,6

MOS: Materia orgánica del suelo, D_{ap}: Densidad aparente, pH: Potencial de hidrógeno.

VARIABLES EVALUADAS

El carbono orgánico total (COT, en %) fue estimado calcinando los RO en un horno mufla a 550 °C durante 2 h y determinando la pérdida de peso. Se colocó 1 g de RO, aplicándose la ecuación definida por Gallardo (2017):

$$COT = (100 * g - g_{cenizas}) * 0,45$$

Para determinar las cenizas de las muestras se pesó el material residual después de la calcinación (g). La concentración de N total del sustrato orgánico (Nt) se determinó por el procedimiento Kjeldahl en un equipo NOVATECH (TMECC, 2001) en otra fracción de los RO.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores de COT y Nt residuales fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de promedios mediante la prueba Tukey ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico *Statgraphics Centurión XVII (Statgraphics, 2014)*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Carbono y nitrógeno remanentes en los sustratos orgánicos

Los contenidos de C y N en la biomasa remanente mostraron un comportamiento significativamente diferente durante el año del proceso de descomposición en los cuatro materiales orgánicos (Tabla 3).

Evolución de la concentración de carbono

Se encontró que la concentración de C presente en los bagazos y en compostas al final del experimento fue similar, pero en diferente magnitud, la cual se mantuvo constante prácticamente durante la experimentación, independientemente de la cantidad de C del material en el proceso de descomposición en ambos tipos de suelo (Figura 1 a y b). Este comportamiento ha sido reportado previamente (Martín *et al.*, 1997; Rocha y Ramírez, 2009).

Evolución del C remanente

La Figura 2 a y b exponen el C remanente (referido a 1,00 g inicial) que se mantiene en el material residual durante el periodo de descomposición; en ambos bagazos disminuyó significativamente, el BD presentó una mineralización significativamente más acelerada en ambos suelos (255 y 358 mg de C remanente en Regosol y Luvisol respectivamente), en tanto el BA tuvo una mayor resistencia a la degradación del C (407 y 556 mg de C remanente en Regosol y Luvisol respectivamente). Por otra parte, el comportamiento del C en las dos compostas en ambos suelos fue significativamente más lento y su disminución fue menor; así, la composta de bagazo de autoclave (CBA) tuvo una degradación (693 y 884 mg de C remanente en el suelo Regosol y Luvisol respectivamente), mientras que la composta de bagazo del difusor (CBD) sufrió degradación en ambos suelos (846 y 773 mg de C remanente en el Regosol y Luvisol respectivamente). Nótese que la evolución es similar a la que sigue la MS.

A tenor de lo indicado anteriormente, sería preferible utilizar los bagazos compostados (con relaciones C:N más favorables) para evitar el "hambre de N" que, indudablemente, producen los bagazos (Amaral y Abelho 2016); Babbar y Ewel (1989) estimaron que se deben de utilizar especies más lignificadas y menos lábiles para incrementar contenidos de materia orgánica del suelo MOS, dado que presentan un ritmo de mineralización y liberación de nutrientes más bajo (como serían los bagazos compostados, CBA y CBD), reduciéndose la pérdida por emisión o lixiviación. Rocha y Ramírez (2009), reportaron que de un año de evaluar la descomposición de la biomasa de siete especies en dos sitios de Chiapas México, encontraron diferencias significativas en la concentración inicial y final de C y N y, en la relación C:N (encontrándose valores de 50 - 52 % para C, 1,0 - 1,2 % para N y relaciones C:N de 31,5 - 47,8 en el primer sitio, mientras que para el sitio dos los valores de N, C y las relaciones C:N fueron 48,6 - 52,5, 0,8 - 1,6 y 29,3 - 60,8 %, respectivamente; los materiales evaluados al final del experimento mostraron que el contenido de C se mantuvo constante, mientras que el contenido de N

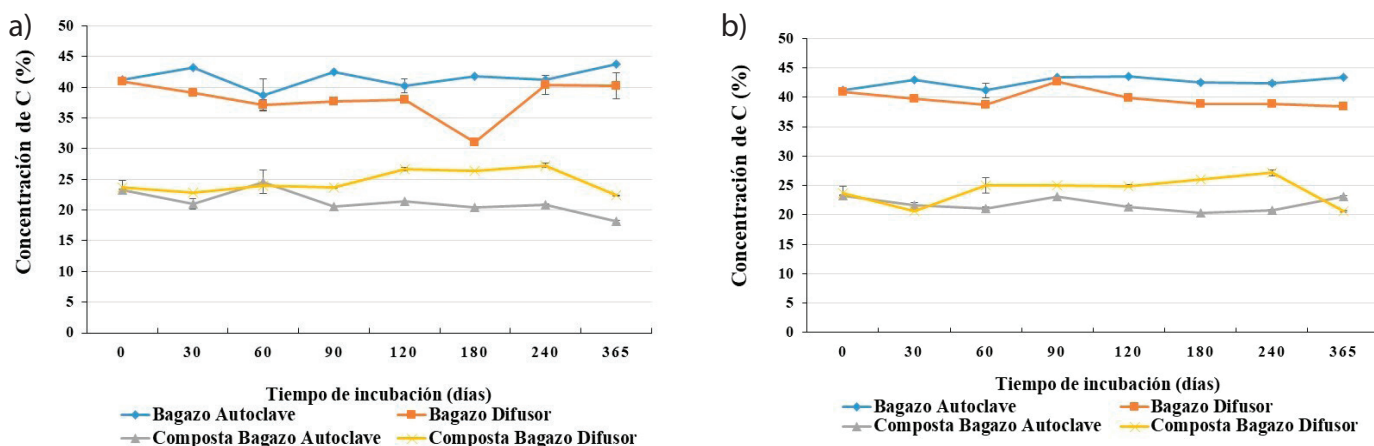


Figura 1. Concentración de C remanente de los materiales orgánicos en suelos Regosol (a) y Luvisol (b). Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0,05$).

Figure 1. Concentration of remaining C of organic materials in Regosol (a) and Luvisol (b) soils. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P < 0.05$).

aumentó relativamente conforme al tiempo de evaluación, al igual que lo ocurrido en los dos suelos evaluados en este trabajo; Figura 1 a y b; Tabla 3).

Evolución de la concentración de N

La evolución del N no es paralela a la del C, pues tiende a mantenerse dentro de la biomasa microbiana en el caso de las compostas (Figura 3 a y b), incluso incrementa significativamente su concentración relativa en el caso de los bagazos (inicialmente muy pobres en N). A los 365 d de evaluación el BA y el BD presentaron un incremento relativo de 1,3 y 1,1 % de N en el Regosol (Figura 3 a y b), mientras que en el Luvisol no se presentó el mismo comportamiento, ya que todos los tratamientos mantuvieron sus concentraciones iniciales. Las dos compostas (CBA y CBD) no presentaron un incremento significativo en la concentración en ambos suelos, aunque la concentración de N en los bagazos compostados descendió rápidamente durante los primeros 30 d al ser sometidos a la degradación edáfica en el Regosol; pero, a partir de los 120

d aproximadamente, se presentó un aumento relativo en la concentración de N en dichas compostas en el Regosol. La concentración de N en los RO, tanto los que se incubaron frescos (BA y BD) como los que sufrieron compostaje previo (CBA y CBD), descendió rápidamente durante los primeros 30 d, lo que muestra un intenso ataque microbiano (Silva *et al.*, 2008). Comportamientos similares a los indicados aquí son los usuales encontrados por numerosos autores como Martín *et al.* (1997), y Amaral y Abelho (2016), y se producen por la tendencia de la microbiología a bioacumular los nutrientes limitantes.

Evolución del N remanente

La Figura 4 a y b evidencian que el comportamiento del N remanente con la materia seca residual (MSR) no presenta una dinámica constante, mostrando variaciones durante el año de estudio, en especial en el Regosol, siendo menos pronunciadas en el Luvisol como sucedía con las concentraciones de N (Figura 3 a y b), respecto a la cantidad de N

Tabla 3. Contenido de carbono y nitrógeno inicial y final, y relación C/N del material remanente de los substratos orgánicos.

Table 3. Initial and final carbon and nitrogen content, and C/N ratio of the remaining material of the organic substrates.

	C (mgC.g)		N (mgN.g)		C:N	
	C _i	C _f	N _i	N _f	Inicial	Final
Suelo Regosol (5,00 g iniciales)						
BA	412 ± 0,2 ^A	438 ± 0,44 ^{Aa}	5,2 ± 0,05 ^C	17,8 ± 0,52 ^{ionAa}	79 ± 29,2 ^A	25 ± 0,76 ^{Aa}
BD	409 ± 0,2 ^A	403 ± 0,21 ^{B*}	5,6 ± 0,01 ^C	16,4 ± 0,06 ^{Ba}	74 ± 0,5 ^A	25 ± 0,03 ^{Aa}
CBA	233 ± 1,2 ^B	182 ± 2,2 ^{Db}	13 ± 0,01 ^B	17,8 ± 0,05 ^{Aa}	18 ± 0,8 ^B	10 ± 3,4 ^{Ca}
CBD	237 ± 11,5 ^B	224 ± 0,61 ^{Ca}	19 ± 0,00 ^A	15,6 ± 0,00 ^{Bb}	13 ± 6,8 ^B	14 ± 4,8 ^{Bb}
Suelo Luvisol (5,00 g iniciales)						
BA	412 ± 0,2 ^A	433 ± 0,68 ^{A b}	5,2 ± 0,05 ^C	10,2 ± 0,08 ^{Cb}	79 ± 29,2 ^A	42 ± 0,27 ^{Ab}
BD	409 ± 0,2 ^A	385 ± 0,27 ^{B*}	5,6 ± 0,01 ^C	10 ± 0,20 ^{Db}	74 ± 0,5 ^A	40 ± 0,82 ^{Ab}
CBA	233 ± 1,2 ^B	231 ± 1,9 ^{Ca}	13 ± 0,01 ^B	16,2 ± 0,01 ^{Bb}	18 ± 0,8 ^B	14 ± 0,10 ^b
CBD	237 ± 1,5 ^B	207 ± 1,3 ^{Db}	19 ± 0,00 ^A	17 ± 0,10 ^{Aa}	13 ± 6,8 ^B	12 ± 0,01 ^{Ba}

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. *No se encontraron diferencias significativas. ± Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0,05$); letra minúscula comparación entre suelos; letra mayúscula comparación entre tiempos inicial y final.

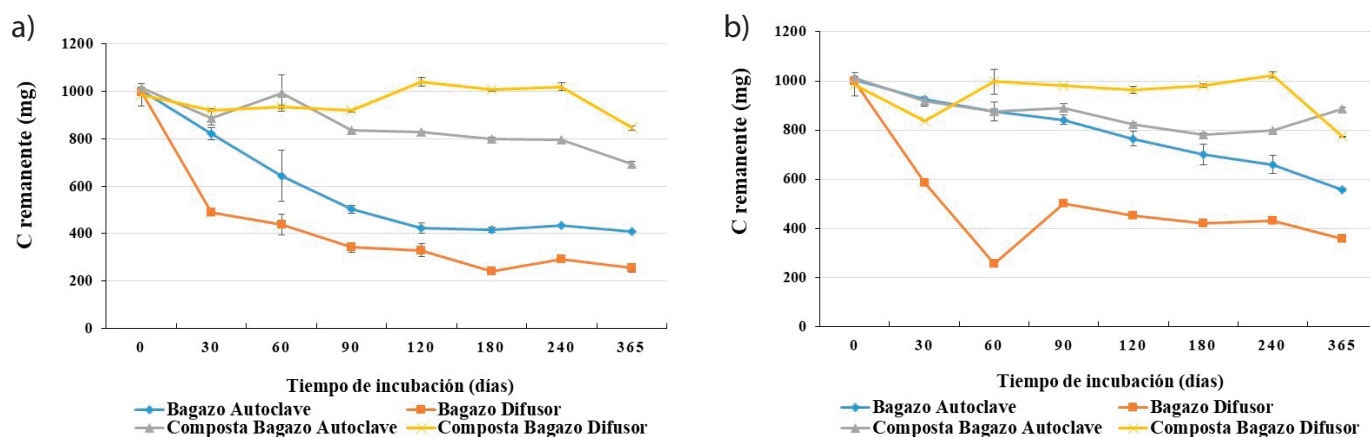


Figura 2. Evolución del C remanente de los materiales orgánicos en suelos Regosol (a) y Luvisol (b). Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0,05$). Carbono referido a 1,00 g de materia seca inicial.

Figure 2. Evolution of the remaining C of organic materials in Regosol (a) and Luvisol (b) soils. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P < 0.05$). Carbon referred to 1,00 g of initial dry matter.

absoluto se observa un incremento en ambos suelos tanto para el tratamiento BA, como para el CBD.

Se puede observar que el comportamiento de los cuatro materiales los separa en dos grupos (Figura 4 a y b) que no obedecen a bagazos o compostas (como sucede en el caso de la materia seca y del C), el primero lo forman los tratamientos BD y CBA quienes mostraron un incremento en el contenido de N en suelo Regosol (20 %) debido a una mayor actividad de mineralización por los microorganismos quienes inmovilizaron este excedente, mientras que el grupo BA y CBD la menor actividad de mineralización generó por el contrario la pérdida del N en los materiales. En el Luvisol todos los tratamientos presentaron una disminución del N remanente excepto el BA; siendo mayor la pérdida en el grupo BD y CBA con un 50 %, lo cual indica que las condiciones de intercambio coloidal de las arcillas para retener el nitrógeno mineralizado, en este suelo son mayores que en el Regosol. Existe un incremento absoluto de N en el bagazo

BA al final del proceso en el Regosol (Figura 4 a y b) que, indudablemente, deber ser aportado por este suelo durante el proceso de su degradación (produciendo previsiblemente "hambre de N"), a no ser que se produzca una significativa fijación de N por bacterias (Martín *et al.*, 1997). Los diferentes factores actuantes (tipos de sustratos, tratamientos o suelos) determinan que los resultados sean diferentes, como igualmente muestra la bibliografía (Gallardo, 2017; Bonilla *et al.*, 2020).

Evolución de la relación C/N de los sustratos orgánicos

Transcurridos los 12 meses de degradación los bagazos disminuyeron la relación C:N alrededor de un tercio en el Regosol, mientras que en el Luvisol descendió a la mitad; ello está en consonancia con las pérdidas de peso (C y N) sufridas durante la degradación (ya se sabe que lo que se pierde es, fundamentalmente, CO₂); al final del experimento la razón C/N de los bagazos bajó a valores aproximados de

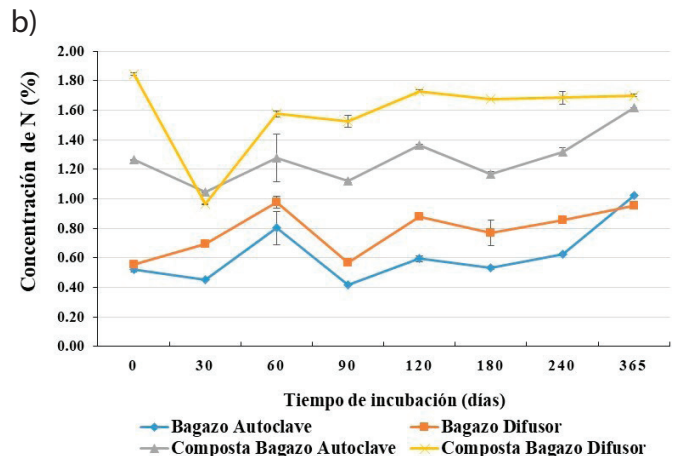
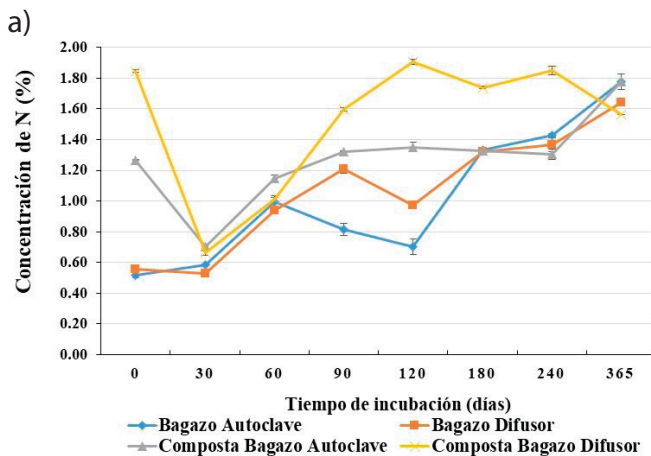


Figura 3. Concentración de N remanente de los materiales orgánicos en suelos Regosol (a) y Luvisol (b). Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0,05$).

Figure 3. Remaining N concentration of organic materials in Regosol (a) and Luvisol (b) soils. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P < 0.05$).

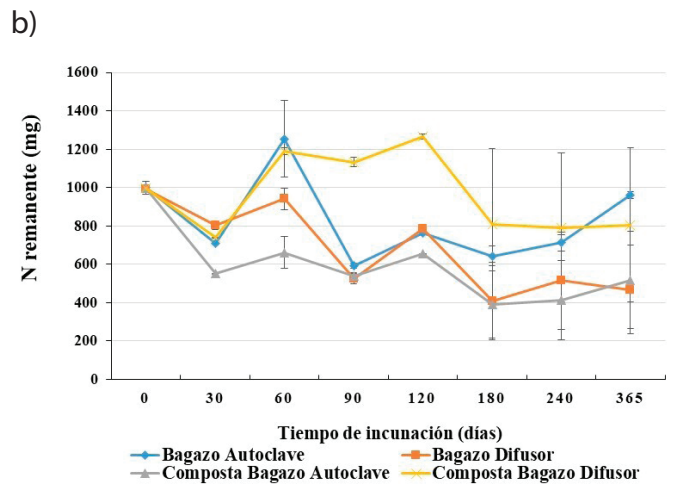
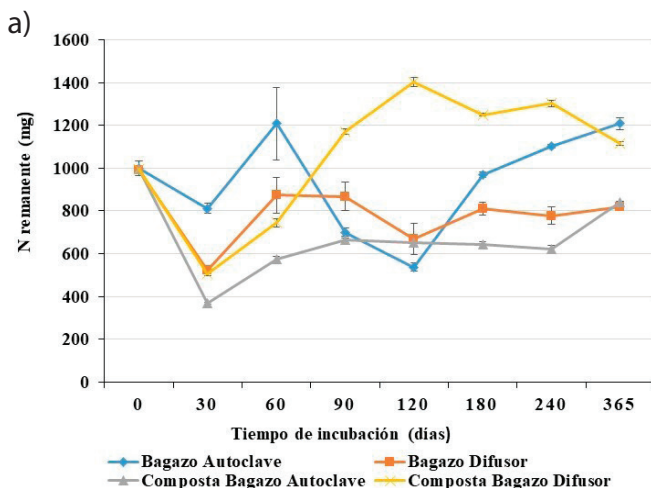


Figura 4. Evolución del N remanente de los materiales orgánicos en suelos Regosol (a) y Luvisol (b). Barras verticales: Error estándar de las medias. Tukey ($P < 0,05$). Carbono referido a 1,00 g de materia seca inicial.

Figure 4. Evolution of remaining N of organic materials in Regosol (a) and Luvisol (b) soils. Vertical bars: Standard error of the means. Tukey ($P < 0.05$). Carbon referred to 1,00 g of initial dry matter.

25 y 40 en el Regosol y Luvisol respectivamente (Tabla 3); sin embargo, las compostas mantuvieron sus relaciones C:N un valor similar a los valores iniciales (oscilante entre 10 y 14). Es interesante hacer notar que mientras en el Luvisol se discrimina fácilmente la evolución del porcentaje de N relativo entre bagazos y compostas (Figura 3 a y b), ello no sucede en el Regosol, con lo que se denota de nuevo el efecto protector de las arcillas (Gili *et al.*, 2011). El incremento absoluto de N, en los RO estudiados justifican la caída de la razón C/N final a 25 (Tabla 3). Además, existe un incremento más neto de ganancia absoluta de N en CBD también con el Regosol, a pesar de su relativamente favorable relación C/N inicial (14), lo cual justifica que esa relación cae significativamente al final del proceso a un valor tan bajo como 10 (Tabla 3). Que suceda en ambos casos en el Regosol indica que, sin duda, los microorganismos aprovecharon mejor el N disponible edáfico, menos protegido por las arcillas. Por otra parte, la relación C/N en CBA se mantuvo más o menos estable. Con base en lo anterior, Gómez *et al.* (2020), al evaluar la dinámica de raíces de maíz y la actividad biológica en dos tipos suelos, encontraron un efecto de enriquecimiento de N a medida que los residuos se degradan (por lo tanto, causando caída de la relación C/N), lo cual indica que se tendrá mayor bioacumulación de N (inmovilización biológica). Nótese que al añadirse estos bagazos al Luvisol el efecto de "hambre de N" será menos acusado al quedar con un valor final de C/N más alto (42 y 40, lo que significa un menor consumo de N edáfico) que el que sucede en el Regosol (donde la relación C/N baja a 25, lo que implica una gran sustracción de N al suelo; Tabla 3); sin duda ambos bagazos sin compostar causarían, con seguridad, "hambre de N" al añadirse al suelo si existieran plantas cultivadas (Knapp *et al.*, 1983; Reinertsen *et al.*, 1984); por ello siempre sería preferible enterrar los RO ya compostados (en especial CBA con una razón C/N más equilibrada, con un valor de 18; Crespo *et al.*, 2013); por el contrario, la razón C/N de CBD no es óptima (demasiado baja, con un valor de 12; Tabla 3) lo que sin duda liberará demasiado N, pudiendo producirse lixiviación y, por ende, contaminación nitrogenada (Cerón y Aristizábal, 2012). No obstante, hay que considerar que los residuos resultantes de los bagazos sin compostar, después de incorporarlos al Luvisol, siguen teniendo relaciones C/N demasiado altas (42 y 40; Tabla 3), por lo que se recomiendan añadirlos al suelo ya compostados; si bien es verdad que, dentro de las compostas, es siempre conveniente que la relación C/N no sea demasiado baja (por ejemplo, inferior a 18,0; Pérez *et al.*, 2011; Gallardo, 2017; Cordero *et al.*, 2018) para evitar contaminaciones nítricas, cosa que debe suceder con la composta CBD (relación C/N 13; Tabla 2) como se ha indicado.

CONCLUSIONES

La concentración relativa de C ($\text{mgC}\cdot\text{g}^{-1}$) presente en los subproductos estudiados se mantiene constante durante el proceso de degradación en el suelo; sin embargo, el C remanente (en términos absolutos) disminuye conforme pasa el tiempo paralelamente a la pérdida de materia seca hasta

el final de la evaluación, muy notablemente en los bagazos frescos.

Respecto al N presente en los bagazos su concentración aumenta cuando se expresa en concentración en el sustrato (mg N g^{-1}); referido a valores absolutos de N remanente, salvo el primer mes, se denota una clara inmovilización biológica de N; no obstante, la utilización práctica de este incremento absoluto de N se ve reducida por los riegos de producir fenómenos de "hambre de N" en las cosechas.

Se produce, como consecuencia de lo anterior, una muy significativa reducción de la relación C/N en los bagazos, que es poco pronunciada en el bagazo ya compostado.

REFERENCIAS

- Amaral, F. y Abelho, M. 2016. Effects of agricultural practices on soil and microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus content: a preliminary case study". Web Ecol. 16: 3-5.
- Aranda, O.S. 2013. Enfermedades Bacterianas Asociadas a Semillas de Cereales. Revista Mexicana de Fitopatología. 31: 71-72.
- Babbar, L.I. y Ewel, J.J. 1989. Descomposición del follaje en diversos ecosistemas sucesionales tropicales. Biotropica. 21: 20-29.
- Base referencial mundial del recurso suelo (WRB) IUSS Working Group. 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos. No. 106. Tercera Edición. FAO. Viale delle Terme di Caracalla, Roma, Italia. 218 p. Disponible en: <https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/clasificacion-de-suelos/base-referencial-mundial/es>.
- Bonilla, C.C., Díaz, J., Gil, C., Girón, K., León, M., Ortiz, O. y Suárez, A. 2020. Dinámica de la descomposición de residuos orgánicos. Suelos Ecuatoriales. 50: 31-39.
- CRT 2020. Consejo regulador del tequila. <http://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/14/11/2020>.
- Cerón, R.L. y Aristizábal, G.F. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología. 14: 285-95.
- Cordero, V.L., Marín, T.R.I. y Silva, M.O. 2018. Producción de composta a base de residuos de orégano, (tallo y hoja) en el Municipio de Rodeo, Dgo. Revista del Desarrollo Urbano y Sustentable. 4: 17-21.
- Crespo, G.M., González, E.D., Rodríguez, M.R., Rendón, S.L., del Real, L.J. y Torres, M.P. 2013. Evaluación de la composta de bagazo de agave como componente de sustratos para producir plántulas de agave azul tequilero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4: 1161-1173.
- Gallardo, J.F. 2017. La materia orgánica del suelo: residuos orgánicos, humus, compostaje, captura de carbono. Texcoco (México): Universidad Autónoma de Chapingo. I.S.B.N.:978-607-12-0474-5. 424 pp.
- Gili, P., Irisarri, J., Tasile, V., Behemer, S., Starik, C. y Sagardoy, M. 2011. Descompactación de suelos de huertos de manzanos (*Malus domestica* Borkh.) bajo riego en el alto valle de río negro-argentina. Agro Sur. 39: 67-78.
- Gómez, M.F., Noellemeyer, E.J. y Frasier I. 2020. Dinámica de raíces y actividad biológica en secuencias de cultivos en dos tipos de suelo de la región semiárida central. Ciencia del Suelo. 38: 56-71.

- González, O.H., Sadeghian, K.S., Zapata, H.R.D. y Mejía, M.B. 2008. Fraccionamiento de la materia orgánica en suelos de la zona cafetera de Caldas. *Cenicafé*. 59: 310-320.
- Heal, O.W., Anderson, J.M. y Swift, M.J. 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. En: Cadisch G y Giller KE (ed.), pp 3-30. Wallingford. Oxon: CAB International.
- Iñiguez, G., Martínez, G.A., Flores, P.A. y Virgen, G. 2011. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distinta de bagazo de Agave para la obtención de un substrato para jitomate. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 27: 47-59.
- Kirschbaum, M.U.F. 1995. The temperatura dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 753-760.
- Knapp, E.B., Elliot, L.F. y Campbell, G.S. 1983. Carbon, nitrogen, and microbial biomass interrelation during the decomposition of wheat straw: A mechanistic simulation model. *Soil Biology and Biochemistry*. 15: 455-461.
- López, L.A., Dávila, V.G., León, B.E., Villegas, G.E. y Gallardo, V.J. 2010. Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 9: 109-116.
- Martín, A., Gallardo, J.F. y Santa Regina, I. 1997. Long-term decomposition process of leaf litter from *Quercus pyrenaica* forests across a rainfall gradient (Spanish Central System). *Annals of Forest Science*. 54: 191-202.
- Mendoza, C.A., Regner, P., Turrión, M.B., Pando, V. y Aceñolaza, P.G. 2017. Pérdida de peso durante la descomposición de hojas de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch en plantaciones de diferentes edades. *Quebracho*. 25: 91-100.
- Pérez, A., Saucedo, O., Iglesias, J., Wencomo, H.B., Reyes, F., Oquendo, G. y Milián, I. 2010. Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Pastos y Forrajes*. 33: 1-26.
- Pérez, Q.J., Delpiano, C.A., Snyder, K.A., Johnson, D.A. y Franck, N. 2011. Carbon pools in an arid shrubland in Chile under natural and afforested conditions. *Journal of Arid Environments*. 75: 29-37.
- NOM-021-RECNAT-2000 (Norma Oficial Mexicana). 2002. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. SEMARNAT. México, D. F. 85 p.
- Reinertsen, S.A., Elliot, L.F., Cochran, V.L. y Campbell, G.S. 1984. Role of available carbon and nitrogen in determining the rate of wheat straw decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*. 16: 459-464.
- Rocha, L.A. y Ramírez, M.N. 2009. Producción y descomposición de hojarasca en diferentes condiciones sucesionales del bosque de pino-encino en Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 84: 1-12.
- Sánchez, S., Crespo, G., Hernández, M. y García, Y. 2008. Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. *Pastos y Forrajes*, 31: 99-108.
- Silva, G.T., Matos, V.L., Nóbrega, O.P., Carneiro, C.E. y De Resende, S.A. 2008. Chemical composition and decomposition rate of plants used as green manure. *Scientia Agrícola*. (Piracicaba, Brasil). 65: 298-305.
- Sun, L., Teramoto, M., Liang, N., Yazaki, T. y Hirano, T. 2017. Comparison of litter-bag and chamber methods for measuring CO₂ emissions from leaf litter decomposition in a temperate forest. *Journal of Agricultural Meteorology*. 73: 59-67.
- Statgraphics, C. 2014. Statgraphics Centurion XVII. User Manual. Version, 17 (8.0). Herndon, USA.
- Torres, R., Lugo, C., Gordon, E. y Suarez, V.L. 2013. Descomposición foliar *in situ* de *Heliconia marginata* en un humedal herbáceo (Barlovento, Venezuela). *Polibotánica*. 35: 21-40.
- Turián, A.T., Huato, M.Á., Ramírez, V.B., Juárez, S.J. y Chulín, E.N. 2012. Manejo tradicional e innovación tecnológica en cultivo de maíz en San José Chiapa, Puebla. *Rev. Mexicana Ciencias Agrícolas*. 3: 1085-1100.
- TMECC. 2001. Test method for the examination of composting and compost. US Composting Council Research & Education Foundation, y U.S.D.A. CD-ROM Co. Nueva York. Compact disc.
- Trofymow, J.A., Moore, T.R., Titus, B., Prescott, C., Morrison, I., Siltanen, M., Smith, S., Fyles, J., Wein, R., Camiré, C., Duschene, L., Kozak, L., Kranabetter, M. y Visser, S. 2002. Rates of litter decomposition over 6 years in Canadian forests: influence of litter quality and climate. *Canadian Journal of Forest Research*. 32: 789-804.
- Verhoef, H.A. y Brussaard, L. 1990. Decomposition and nitrogen mineralization in natural and agro-ecosystems: the contribution of soil animals. *Biogeochemistry*. 11: 175-211.
- Wendling, B., Jucksch, I., Mendonça, E.S., Neves, J.C.L., Silva, I.R. y Costa, L.M. 2008. Organic-Matter Lability and Carbon-Management Indexes in Agrosilvopasture System on Brazilian Savannah. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39: 1750-1772.
- Wiesenberg, G.L.B., Dorodnikov, M. y Kuzyakov, Y. 2010. Source determination of lipids in bulk soil and soil density fractions after four years of wheat cropping. *Geoderma* 156: 267-277.

Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of resistant starches obtained by autoclaving and lintnerization from native corn, apple and malanga starches

Propiedades fisicoquímicas y digestibilidad *in vitro* de almidones resistentes obtenidos por autoclaveado y lintnerización a partir de almidones nativos de maíz, manzana y malanga

Viridiana Aguilar-Mendoza¹, Paul Baruk Zamudio-Flores^{1*}, Francisco Javier Molina-Corral¹, Guadalupe Isela Olivas-Orozco¹, Gilber Vela-Gutierrez², Maria Hernandez-Gonzalez³, Haydee Yajaira Lopez-De la Peña³, Adalberto Ortega-Ortega⁴, Rene Salgado-Delgado⁵, Vicente Espinosa-Solis⁶

¹ Center for Research in Food and Development, A.C. Cuauhtemoc Unit, Food Physiology and Technology from the Temperate Zone. Avenida Rio Conchos s/n, Industrial Park, PO Box 781, C.P. 31570, Cuauhtemoc City, Chihuahua, Mexico.

² Laboratory for Research and Development of Functional Products. Faculty of Nutrition and Food Sciences. University of Sciences and Arts of Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel, C.P. 29000, Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico.

³ Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923. C.P. 2315, Buenavista, Saltillo Coahuila, Mexico.

⁴ Faculty of Agrotechnological Sciences, Autonomous University of Chihuahua, Extension Cuauhtemoc, Barrio de la presa s/n, Ciudad Cuauhtemoc, Chihuahua, Mexico, C.P. 31510.

⁵ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Zacatepec, Graduate-Department of Chemical Engineering and Biochemistry, Calzada Tecnológico 27, Zacatepec, Morelos, Mexico, C.P. 62780.

⁶ Autonomous University of San Luis Potosí. Academic Coordination of the South Huasteca Region of the UASLP, km 5, highway Tamazunchale-San Martín, C.P. 79960, Tamazunchale, San Luis Potosí, Mexico.

ABSTRACT

In this research, the effect of the application of successive autoclaving/cooling and lintnerization (acid hydrolysis) cycles in native starches of corn (NCS), apple (NAS), and malanga (NMS) on the formation of resistant starch (RS) was evaluated, and the physicochemical properties and *in vitro* digestibility of the obtained starches were studied. Autoclaved malanga starch (AMS) presented the highest RS content (14 %) compared to all analyzed starches. Enzymatic hydrolysis of native and modified starches indicated that autoclaving/cooling decreased amylolysis ($\approx 24 - 41\%$), while with the lintnerization treatment, the reduction was lower ($\approx 3 - 21\%$), both results compared to their native counterparts. Autoclaving and lintnerization treatments reduced the apparent amylose content by $\approx 5\%$, producing amylose with lower molecular weights ($\approx 80 - 87$ kDa) for autoclaved starches, and $\approx 92 - 101$ kDa for lintnerized starches. The luminosity decreased due to the autoclaving treatment and not to the lintnerization process. These results suggest that malanga starch subjected to autoclaving/cooling cycles could be used in baking applications where an increase of the RS content without affecting the sensory color characteristics is desired.

Keywords: Conventional and unconventional sources of starch, acid hydrolysis, resistant starch, *in vitro* starch hydrolysis.

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto de la aplicación de ciclos sucesivos de autoclaveado/enfriamiento y lint-

nerización (hidrólisis ácida) en almidones nativos de maíz (NCS), manzana (NAS) y malanga (NMS) sobre la formación de almidón resistente (AR) y se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y digestibilidad *in vitro* de los almidones obtenidos. El almidón de malanga autoclaveado (AMS) presentó el mayor contenido de AR (14 %) en comparación con todos los almidones analizados. La hidrólisis enzimática de los almidones nativos y modificados indicó que el tratamiento de autoclave/enfriamiento disminuyó la amilólisis ($\approx 24 - 41\%$); mientras que con el tratamiento de lintnerización, la reducción fue menor ($\approx 3 - 21\%$), ambos resultados comparados con sus contrapartes nativas. Los tratamientos por autoclaveado y lintnerización redujeron el contenido de amilosa aparente en $\approx 5\%$, produciendo amilosas con menores pesos moleculares ($\approx 80 - 87$ kDa) para los almidones autoclaveados, y $\approx 92 - 101$ kDa para los almidones lintnerizados. La luminosidad disminuyó por el tratamiento en autoclave y no por el proceso de lintnerización. Estos resultados sugieren que el almidón de malanga sometido a ciclos de autoclaveado/enfriamiento podría aprovecharse en aplicaciones de panificación donde se desea aumentar el contenido de AR sin afectar las características sensoriales de color.

Palabras clave: Fuentes convencionales y no convencionales de almidón, hidrólisis ácida, almidón resistente, hidrólisis de almidón *in vitro*.

INTRODUCTION

Starch is considered the main polysaccharide reserve in vegetables and constitutes the most abundant carbohydrate

in human nutrition, because it plays an important role in supplying metabolic energy (Obadi *et al.*, 2020). Due to its intestinal digestibility, starch is classified into three fractions: rapidly digestible (RDS), slowly digestible (SDS), and resistant starch (RS), which are digested *in vitro* within the first 20 min, and from 20 to 120 min, or not digested at all, respectively (Ratnaningsih *et al.*, 2019). In the scientific literature, it has been reported that through a variety of physical treatments (heat-moisture treatment, autoclaving, and cooking/cooling cycles), chemical treatments (acid hydrolysis or lintnerization, phosphorylation, acetylation, oxidation, and carboxymethylation) and by enzymatic methods (using β -amylase, isoamylase, pullulanase enzymes), it is feasible to increase the starch RS content from different botanical sources (Chiu and Solarek, 2009). For its study, RS can be classified into five types: RS1 is the one that is physically inaccessible inside the plant tissue, trapped in a protein or cellulose matrix; RS2 is the native starch in the granules, resistant due to its semi-crystalline character; RS3 is considered as retrograde starch, and is produced by physical treatments like heat-moisture and temperature cooling cycles; RS4, is obtained by the chemical modification of native starch; and RS5 which is an amylose-lipid complex, assuming that the aliphatic part of the lipid is included within the amylose helix (Ma and Boye, 2018). The nutritional and physiological importance of RS relies on the fact that it is considered a functional ingredient. It can prevent cardiovascular diseases, colon cancer, type 1 and 2 diabetes, obesity, osteoporosis, hypertension, improve intestinal health, micronutrient absorption, lipid profile, satiety, and the development of probiotic microorganisms (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010; Ashwar *et al.*, 2016c).

In addition, RS3 can be obtained by autoclaving-cooling cycles of native starch, a simple, safe, and economical physical method (Ratnaningsih *et al.*, 2019). The RS4 resistance is achieved by starch chemical modifications such as lintnerization, esterification, etherification, and crosslinking (Ashwar *et al.*, 2016a). Raungrusmee and Anal (2019) reported a 64% increase in rice starch RS content by autoclaving and lintnerization. Concerning this, in the scientific literature, there are reports on obtaining and characterizing RS from native starch of the main conventional sources of tubers and cereals, such as potato (Kwon *et al.*, 2019), cassava (Abioye *et al.*, 2017), rice (Raungrusmee and Anal, 2019), wheat (Punia *et al.*, 2019) and corn (Li *et al.*, 2020), being the latter the most widely cultivated cereal in the world and the main conventional source of starch (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2019).

Within the feasible non-conventional sources, apple (*Malus domestica* B.) is one of the most consumed fruits worldwide; this fruit, in an immature physiological state and its waste (the part that is not industrialized) is rich in carbohydrates, mainly starch (Kringel *et al.*, 2020). Although the native starch obtained from apples has been characterized (Stevenson *et al.*, 2006; Tirado-Gallegos *et al.*, 2016), to our knowledge there are no reports on obtaining RS from native apple starch. On the other hand, white malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and yellow malanga or taro (*Colocasia*

esculenta), are perennial herbaceous plants widely cultivated in tropical regions, which form corms rich in starch. Although native and modified starches have been obtained from both *Xanthosoma sagittifolium* (Ojinnaka *et al.*, 2009) and *Colocasia esculenta* (Deka and Sit, 2016), reports on obtaining RS from these species are insufficient. Simsek and El (2012) produced 35 % RS3 by autoclaving native starch from *Colocasia esculenta*. Espinosa-Solis *et al.* (2021) recently reported the feasibility of obtaining RS3 from malanga flour using the autoclave hydrothermal treatment and performing the RS characterization. Thus, this study aimed to assess the effect of the application of successive cycles of autoclaving/cooling and lintnerization (acid hydrolysis) on the formation of RS3 and RS4, respectively, from native corn, apple, and malanga starches and in evaluating its physicochemical properties and their *in vitro* digestibility. The information obtained could suggest the potential of these resistant starches in food applications, with possible benefits for human health.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Commercial corn starch (Maizena™, Unilever, Mexico) was acquired at a local market (Cuauhtemoc City, Chihuahua, Mexico). Apples of the Golden Delicious Smoothie variety were used. These fruits were obtained 70 days after full flowering (DAFF) and provided by a commercial orchard in Cuauhtemoc City (Chihuahua State, Mexico). Flour from malanga corms (*Xanthosoma sagittifolium*) obtained from plants grown in the municipality of San Fernando (Chiapas State, Mexico) was used. All chemical reagents used were analytical grade and acquired from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico State).

Isolation of native apple starch (NAS)

The native apple starch was obtained within 48 h after harvesting the fruit according to the methodology reported by Tirado-Gallegos *et al.* (2016). For this, apples were washed and cut into small pieces, then soaked in distilled water with 0.16 % potassium metabisulfite and ground in a blender (Osterizer, Blender Classic). The suspension was sieved through a 100 mesh sieve (ASTM) and allowed to stand under refrigeration (4 °C) for 12 h. Then, the supernatant was removed by decantation, and the settled starch layer was re-suspended in distilled water and centrifuged at $10,500 \times g$ for 15 min. Next, the green surface of the obtained pellet was removed with the help of a spatula. The remaining pellet was homogenized with distilled water for 10 min and allowed to stand for 24 h under refrigeration. Then, the supernatant was decanted and washed again; this process was repeated at least three additional times until the supernatant was clear and free of fiber and pigment traces on the sedimented starch. The starch was collected and dried in an oven with hot air circulation at 40 °C for 24 h. Finally, it was ground and sieved in a 100 mesh (ASTM) with a pore opening of 0.149 mm.

Isolation of native malanga starch (NMS)

The starch isolation was carried out according to the methodology reported by Dai *et al.* (2015), with modifications. First, 100 g of malanga flour were suspended in 500 mL of distilled water and homogenized for 1 h under constant stirring at 300 rpm. The dispersion was sieved through organza cloth; the permeate was centrifuged (Allegra 64R) at $10,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellets re-suspended in 1,000 mL of distilled water and kept under stirring for 30 min; this dispersion was sieved through a 250 mesh sieve. The sieve was mixed with 500 mL NaOH 0.05 M and kept under stirring at 300 rpm for 60 min, then centrifuged (10 min at $10,500 \times g$). The supernatant was removed, and the brown layer (pigments, fibers, and proteins) on the pellet's surface was scraped off with the help of a spatula. Subsequently, the starch was washed for 30 min with 0.1 M HCl for neutralization; the dispersion was centrifuged again at $10,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was discarded, and to remove traces of NaCl, the sedimented starch was washed with distilled water (30 min, 300 rpm) and centrifuged (10 min at $10,500 \times g$). The supernatant was decanted, and the starch dried in a forced air oven at 40 °C, ground in a mortar, and sieved through a 100 mesh (ASTM) to standardize the particle size.

Production of RS3 by autoclaving

The production of resistant starch type III (RS3) was done by physical modification of native starch by autoclaving, according to Berry (1986). First, 100 g of native starch were mixed with 350 mL of distilled water and stirred for 15 min (IKA, RW 20 digital). Next, the starch dispersion was heated in an autoclave (121 - 127 °C) for 1 h, allowed to cool, and stored at 4 °C for 24 h. This process was repeated three times. Subsequently, the starch was subjected to a freeze-drying process (LABCONCO) for 72 h and later ground in a mill (IKA M 20 S3). This procedure was applied for NAS to obtain lintnerized apple starch (LAS); also, for NMS to obtain lintnerized malanga starch (LMS) and to NCS to obtain lintnerized corn starch (LCS).

Production of RS4 by lintnerization

The production of resistant starch type IV (RS4) was achieved by chemical modification of native starches with acid hydrolysis, following the methodology of Rivas-González *et al.* (2008). First, 100 g of native starch were mixed with 200 mL of 1 M HCl and stirred for 6 h at 50 rpm and 35 °C. Then, 200 mL of 1 M NaOH (pH 6.0) were added. Next, the starch solids were centrifuged (Allegra 64R) 6 times using 2,000 mL of distilled water. Subsequently, they were dried in an oven at 37 °C for 48 h. This procedure was applied to NAS to obtain autoclaved apple starch (AAS); also, to NMS to obtain autoclaved malanga starch (AMS) and to NCS to obtain autoclaved corn starch (ACS).

Proximal analysis

The following analyses were performed on native and resistant starches (RS3 and RS4). The official AOAC (2002)

methods of analysis described in the 17th Edition (2002), ether extract (954.18, subchapter 4.5.02.), moisture (method 934.01 subchapter 4.1.03), ash (method 942.05 subchapter 4.1.10), proteins (991.20 Subchapter. 33.2.11). Finally, the carbohydrate content was calculated by difference according to the equation 1:

$$\% \text{carbohidratos} = 100 - (\% \text{moisture} + \% \text{lipid} + \% \text{protein} + \% \text{ash}) \quad (1)$$

Enzymatic determinations of total starch (TS), available starch (AS), resistant starch (RS), retrograde resistant starch (RRS)

Total starch (TS)

The TS content of each sample was quantified by means of a determination that estimates the total amount of starch available for enzymatic hydrolysis. This determination was according to Goñi *et al.* (1997). First, 50 mg of starch were dispersed in a 2 M KOH solution for 30 min, to gelatinize all the starch molecules. Subsequently, it was incubated at 60 °C for 45 min (pH 4.75) with an amyloglucosidase enzyme solution (Roché brand, no. 102 857, Roche Diagnostics, IN, USA); after this time, the released glucose was determined using the glucose oxidase/peroxidase assay (GOD/POD) (sera-PAK® Plus, Bayer de Mexico, SA de CV). TS content was calculated as glucose (mg) \times 0.9. Potato starch was used as a reference.

Available starch (AS)

This determination was carried out according to Holm *et al.* (1989). First, 20 mL of distilled water were mixed with a 500 mg sample, stirred for 10 min, and then 100 μ L of Termamyl were added. Next, samples were placed in a boiling bath for 20 min and stirred every 5 min until they completed 20 min; then, samples were cooled to 30 - 40 °C and transferred to a 100 mL volumetric flask. Next, in a glass tube, 1 mL of sodium acetate buffer at pH 4.75, 25 μ L of amyloglucosidase, and 500 μ L of sample from the 100 mL volumetric flask were placed and incubated for 30 min at 60 °C, under constant stirring. Finally, the content of the tube was transferred to a 10 mL volumetric flask, and 50 μ L of the sample was taken to determine the glucose released by enzymatic digestion, using the GOD/POD (glucose/oxidase peroxidase) method, reading the optical densities of the samples at 510 nm in a Spectronic Genesis 5 spectrophotometer (Spectronic Instrument, Inc Rochester, NY, USA).

Resistant starch (RS)

The methodology described by Goñi *et al.* (1996) was used to determine the indigestible starch content. One hundred mg of starch were weighed in a centrifuge tube, and 10 mL of KCl-HCl pH 1.5 buffer were added, followed by 200 μ L of pepsin solution (the pepsin solution prepared in a ratio of 25 mg of pepsin with 250 mL of KCl-HCl buffer per sample). The sample was mixed and left in a water bath at 40 °C for 60 min with constant stirring. Once the time had elapsed, the sample was left to stand at room temperature, and 9 mL of trismaleate buffer at pH 6.9 were added, followed by 40 mg of α -amylase (290 U/mg, from the Sigma-Aldrich brand, San

Luis, Missouri, USA), mixed and incubated for 16 h in a water bath at 37 °C with constant agitation; subsequently, the sample was centrifuged (Allegra 64R) for 15 min at 3000 × *g* at 4 °C. The supernatant was discarded and washed twice with 10 mL of distilled water, centrifuged again, and the supernatant was discarded. Then, 3 mL of distilled water and 3 mL of 4 M KOH were added, and the mixture was left to stand for 30 min at room temperature with constant stirring, then adding 5.5 mL of 2 M HCl and 3 mL of 0.4 M Na acetate buffer (pH 4.75), and subsequently, 25 mL of amyloglucosidase were immediately added and left for 45 min in a water bath at 60 °C with constant stirring. The sample was centrifuged for 15 min at 3000 × *g* at 4 °C and the supernatant was collected and transferred to a 50 mL volumetric flask. The residue was washed twice with 10 mL of distilled water each time, and the supernatant was combined with that previously obtained. Subsequently, it was adjusted to 50 mL, and 50 mL of sample was taken to determine the glucose released by enzymatic digestion, using the GOD/POD method (glucose/oxidase peroxidase, SERA-PAK® Plus, Bayer de México, S.A. de CV), reading the optical densities of the samples at 510 nm in a Spectronic Genesis 5 spectrophotometer (Spectronic Instrument, Inc Rochester, NY, USA).

Retrograde resistant starch (RRS)

The methodology described by Saura-Calixto *et al.* (1993) was used to determine the content of retrograde resistant starch in samples. First, 100 mg of starch were placed in a centrifuge tube, adding 10 mL of 0.08 M phosphate buffer at pH 6.0 and 10 mL of thermostable α-amylase (290 U/mg, Sigma-Aldrich brand, San Luis, Missouri, USA), and incubated in a boiling water bath for 30 min with constant stirring. Subsequently, they were allowed to cool to room temperature, then 2 mL of 0.0275 N NaOH and 100 µL of protease (170 U/mg, Sigma-Aldrich brand, San Luis, Missouri, USA) were added and incubated at 60 °C for 30 min with constant stirring, and allowed to cool to room temperature. Two mL of 0.325 N HCl and 60 µL of amyloglucosidase (15 U/mL, Roche, IN, USA) were added and incubated at 60 °C for 30 min. The sample was centrifuged for 15 min at 3000 × *g* at 4 °C, and the supernatant discarded. The residue was washed with 10 mL of distilled water, 10 mL of 96 % ethyl alcohol, and 10 mL of acetone, then centrifuged, and the supernatant discarded. Three mL of distilled water were added to the residue and dispersed. Subsequently, 3 mL of 4 M KOH were added and kept under stirring for 30 min at room temperature (25 ± 3 °C). Then, 5.5 mL of 2 N HCl, 3 mL of acetate buffer at pH 4.78 and 60 µL of amyloglucosidase (15 U/mL, Roche brand, IN, USA) were added and incubated at 60 °C for 30 min with constant agitation. Then, it was centrifuged at 3000 × *g* for 15 min at 4 °C, the supernatant saved, and the residue re-suspended in 10 mL of distilled water; the centrifugation was repeated 2 more times. Three mL of distilled water and 3 mL of 4 M KOH were added to the residue, and was kept under constant stirring for 30 min at room temperature. Then, 5.5 of 2N HCl, 3 mL of acetate buffer at pH 4.78 and 60 mL of

amyloglucosidase (15 U/mL, Roche, IN, USA) were added, followed by an incubation at 60 °C for 30 min under constant stirring. Subsequently, it was centrifuged at 3000 × *g* for 15 min at 4 °C, the supernatant saved and re-suspended in 10 mL of distilled water. Centrifugation was repeated, and the supernatants were collected and calibrated at 100 mL. Fifty µL were used to determine the glucose content by the GOD/PAD method (glucose/oxidase peroxidase, SERA-PAK® Plus, Bayer de México, S.A. de C.V.), reading the optical densities of the samples at 510 nm in a Spectronic Genesis 5 spectrophotometer (Spectronic Instrument, Inc Rochester, NY, USA).

Color evaluation

It was carried out using a Minolta colorimeter (Model CR-300, Osaka, Japan), and the color variables were reported according to the CIELAB system (L, a*, b*) in addition to the chroma variables (color saturation) and °hue (hue) according to the methodology reported by Aboubakar *et al.* (2008). The instrument was calibrated using a white reference tile. Measurements were made in a glass cell containing the powdered starch on the light source (this cell was placed on a white base), and values recorded in quintuplicate for each starch.

Determination of apparent amylose content

For this determination, the starches were defatted in a Soxhlet with an 85 % methanol solution for 24 h. Subsequently, they were washed with ethanol and recovered by filtration. Iodine affinities of defatted starches were measured using an automatic potentiometer (702 SM Tirino, Metrohm, Herisau, Switzerland). Apparent amylose content was calculated by dividing the iodine affinity of defatted starches by 20 %.

Determination of amylose molecular weight

The methodology reported by Torruco-Uco *et al.* (2016) was used to determine the molecular weight of amylose. Pullulan standards of various molar masses (1.6×10^6 , 3.8×10^5 , 1.8×10^5 , 1.0×10^5 , 4.8×10^4 and 1.2×10^4 g/mol) were used to obtain a linear calibration. Pullulans were dissolved in HPLC-grade water at 25 °C, kept in the dark (overnight), filtered using a 0.2 µm nylon syringe filter, and injected into the HPSEC-RI system. The amylose solubilization procedure was performed with 50 s of microwave heating. The supernatant solution was filtered through a 5 µm nylon syringe filter. The solution was injected (50 µL) into the HPLC AT 1100 (Agilent Technology, Deutschland GmbH Waldbronn, Germany) with gel permeation chromatography-size exclusion chromatography (HPLC-SEC) PL aquagel-OH mixed, 8 µm column (7.5 mm ID × 300 mm; Agilent Technologies Deutschland GmbH Waldbronn, Germany).

The column and detector were kept at 30 °C. HPLC-grade water was used as diluent, carefully degassed, and filtered through Durapore GV membranes (0.2 µm) before use. A flow rate of 1.0 mL/min was used. Data analysis was performed using Agilent's GPC software (Agilent Technologies Deutschland GmbH Waldbronn, Germany). After filtration, the carbohydrate concentration of the supernatant solution was

measured by the sulfuric acid-phenol colorimetric method. The procedure was performed at least five times for each sample.

***In vitro* digestibility**

The *in vitro* digestibility was determined by the methodology reported by Zamudio-Flores *et al.* (2015) with modifications, which in turn is based on the methods reported by Englyst *et al.* (1992) and Regand *et al.* (2011). The enzyme solution for digestion was prepared as follows: 0.9 g of porcine pancreatin (EC 232.468.9, from pig pancreas, activity 8 × USP/g, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 4 mL of distilled water and centrifuged at 1,500 *g* for 10 min.

The supernatant (5.4 mL) was mixed with 0.8 mL of diluted amyloglucosidase [0.64 mL of amyloglucosidase (EC 3.2.1.3, 3300 U/mL, Megazyme) diluted to 0.8 mL of distilled water], and 0.2 mL of distilled water was added. This enzyme solution was prepared for each enzyme digestion. One hundred mg of native starches, RS3, RS4, and control (white bread made with wheat flour) were weighed in 50 mL tubes in triplicate, and 10 glass beads (diameter = 5 mm) were added to each tube. Two mL HCl (0.05 M) and 10 mg pepsin were added to the tubes and incubated (37 °C, 30 min) in a shaking bath. Subsequently, 4 mL of sodium acetate buffer solution (0.5 M, pH = 5.2) were added to each tube; freshly prepared enzyme solution (1 mL) was added at 1 min intervals. The mixtures were incubated at 37 °C in a shaking water bath. Aliquots (100 µL) were taken at intervals of 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 and 180 min and mixed with 50 % ethanol (1 mL). These solutions were centrifuged at 800 × *g* (10 min), and the hydrolyzed glucose content of the supernatant was determined using the glucose oxidase/peroxidase assay (Megazyme). The equation 2 determined the percentage of total starch hydrolysis:

$$\%hydrolysis = \left(\frac{\text{free glucose weight} \times 0.9}{\text{starch weight}} \right) \times 100$$

Statistical analysis

The experiments were carried out using a completely randomized design. A one-way analysis of variance (ANOVA, $p \leq 0.05$) was applied using the statistical program Sigma-Stat, version 2.03 (Fox *et al.*, 1995). The size of the analyzed samples was a minimum of three ($n > 3$), and when significant differences were found, the Tukey test was applied to compare the means (Walpole *et al.*, 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximal chemical analysis

The proximal chemical analysis is shown in Table 1. The NMS and NAS, as well as their respective lintnerized starches (LMS and LAS), presented the highest moisture contents with values that ranged from ≈ 13 % (NAS) up to ≈ 16 % (NMS) although no significant differences were observed between them ($p > 0.05$). On the other hand, every starch subjected to the physical processing of autoclaving presented the lowest moisture percentages, in the following descending order: AAS > ACS > AMS; however, no significant differences ($p > 0.05$) were observed among them. In this regard, lower moisture values have been reported in native corn starches (6.5 - 8.5 %) (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2018), native oat starch (10.03 - 10.63 %) (Shah *et al.*, 2016) and native (4.89 %) and lintnerized (7.99 %) plantain starch (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2005). Recently, it was reported that the moisture content in powders is an essential factor in flow and other mechanical properties and is highly dependent on the method used for its determination, the degree or level of drying, and the humidity in the surrounding atmosphere (Juarez-Enriquez *et al.*, 2019).

The components (mainly lipids and proteins) can influence the functionality of the starch granule; protein is associated with grain hardness; while lipids can significantly reduce the swelling power of starch (Bustillos-Rodríguez *et al.*, 2018). The native and modified starches of corn, malanga, and apple presented proteins, lipids, and ashes values lower than 1 %, with which these polluting components of the starch would be reduced, indicating that these starches

Table 1. Proximal chemical analysis of native, autoclaved, and lintnerized starches from corn, apple, and malanga[®].

Tabla 1. Análisis químico proximal de almidones nativos, autoclaveados y lintnerizados de maíz, manzana y malanga[®].

Sample	Analysis						
	Moisture (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	CHO ¹ (%)	Amylose (%)	MW (kDa) ²
NCS	11.12 ± 0.62 ^{bc}	0.35 ± 0.02 ^b	0.16 ± 0.03 ^{abcd}	0.09 ± 0.02 ^{bcd}	88.29 ± 0.11 ^{bc}	28.62 ± 0.11 ^b	108.28 ± 0.92 ^a
ACS	8.73 ± 0.46 ^{cd}	0.30 ± 0.01 ^{bc}	0.11 ± 0.07 ^{abcd}	0.07 ± 0.01 ^{cde}	90.77 ± 0.09 ^{ab}	23.65 ± 0.10 ^f	86.39 ± 0.08 ^g
LCS	11.45 ± 0.90 ^{bc}	0.20 ± 0.01 ^{de}	0.12 ± 0.01 ^{abcd}	0.03 ± 0.01 ^e	88.20 ± 0.19 ^{bcd}	23.55 ± 0.14 ^f	100.72 ± 0.12 ^b
NMS	16.46 ± 0.22 ^a	0.42 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.01 ^{ab}	82.71 ± 0.05 ^e	29.84 ± 0.10 ^a	95.53 ± 0.14 ^d
AMS	6.05 ± 0.72 ^d	0.33 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.03 ^{ab}	0.15 ± 0.01 ^a	93.24 ± 0.14 ^a	24.82 ± 0.07 ^d	80.44 ± 0.15 ^h
LMS	14.02 ± 1.02 ^{ab}	0.29 ± 0.02 ^{bc}	0.10 ± 0.00 ^{bcd}	0.07 ± 0.00 ^{cde}	85.52 ± 0.19 ^{cde}	24.18 ± 0.06 ^e	91.64 ± 0.09 ^f
NAS	13.21 ± 0.63 ^{ab}	0.26 ± 0.01 ^{cd}	0.17 ± 0.03 ^{abc}	0.11 ± 0.01 ^{abc}	86.26 ± 0.12 ^{cd}	27.37 ± 0.08 ^c	98.23 ± 0.38 ^c
AAS	9.24 ± 0.53 ^{cd}	0.19 ± 0.01 ^e	0.00 ± 0.00 ^d	0.06 ± 0.00 ^{cde}	90.51 ± 0.10 ^{ab}	22.88 ± 0.03 ^g	81.58 ± 0.09 ^h
LAS	14.77 ± 0.54 ^a	0.18 ± 0.02 ^e	0.07 ± 0.03 ^{cd}	0.05 ± 0.00 ^{de}	84.94 ± 0.10 ^{de}	22.69 ± 0.06 ^g	93.59 ± 0.13 ^e

^aMean of at least three repetitions ± standard error. Values with the same letter within columns are not significantly different according to Tukey's test ($p > 0.05$). ¹Total carbohydrates (CHO) were obtained by difference (100 % - % rest of the other components). ²MW = Molecular weight.

were extracted with high purity (Lawal, 2004). Various investigations have reported similar results in native starches from corn, potato, cassava (Waterschoot *et al.*, 2015), malanga (Deka and Sit, 2016), and rice (Ashwar *et al.*, 2016c; Van Hung *et al.*, 2016).

Table 1 also shows that the lintnerization process decreased proteins, lipids, and ashes content in LMS, with significant differences ($p < 0.05$) with respect to its native counterpart; however, in LCS and LAS, this reduction was only observed in proteins and ashes (being statistically significant, $p < 0.05$). This decrement is attributed to the acid used in the lintnerization process, which solubilized an important portion of these components (Aparicio-Sanguilán *et al.*, 2005). After autoclaving modification of native starches, the protein, lipid, and ash content decreased because the thermal treatment caused proteins denaturation and lipids saponification (Aparicio-Sanguilán *et al.*, 2005). In the AMS, the reduction in protein content was significant ($p < 0.05$) compared to NMS. In addition, the AAS protein and lipid content decreased significantly ($p < 0.05$) compared to their native counterpart. At the same time, in the NCS, NMS, and NAS samples, no significant differences were found ($p > 0.05$) in ash content in relation to ACS, AMS, and AAS, respectively, after undergoing the autoclaving process; this was possibly due to the temperature used in the autoclaving process not being high enough to destroy the minerals present in the starch (Aparicio-Sanguilán *et al.*, 2005). These results are consistent with those reported by Aparicio-Sanguilán *et al.* (2005) in autoclaved plantain starches and by Deka and Sit (2016), who reported a similar behavior in starches modified by heat-moisture treatment from malanga.

In relation to the carbohydrate content, no clear or defined trend was observed. In this sense, the autoclaved samples, in general, presented the highest values, while the samples lintnerization did not cause significant changes ($p > 0.05$) with respect to their native counterparts. This could be due to the fact that the values of these components were obtained by difference, which is related to the value of the other components (moisture, proteins, lipids, and ashes). This has been previously reported by Vargas *et al.* (2016) in acetylated potato starches. Regarding the similarities between the conventional and unconventional sources in this determination, NMS and NAS did not present significant differences ($p > 0.05$) in lipids and ashes content compared to NCS.

Apparent amylose content

The amylose contents for the NCS, NMS, and NAS samples were ≈ 29 , 30, and 27 %, respectively (Table 1). Some studies have reported lower amylose content in corn (22.5 %) (Jane *et al.*, 1999) and malanga starch (22.7 %) (Lawal, 2004), while a value within the interval of 26 - 29.1 % for apple starch was reported by Stevenson *et al.* (2006). The differences found may be due to the variety, harvesting time, and place of cultivation (Simsek and El, 2012). On the other hand, in the modified starches (autoclaved and lintnerized), the amylose content decreased significantly ($p < 0.05$) due to the selective

elimination of amorphous zones during those modifications. The reduction in amylose content in the autoclaved starches is consistent with that reported in the literature for malanga starch modified by a convection process with a hot air oven, where that decrement was attributed to the union of the amylose chains already present with each other or to the amylopectin molecule (Deka and Sit, 2016). However, Babu *et al.* (2014) reported the opposite of this study in autoclaved banana starch where the amylose content increased after autoclaving, which they attributed to a possible partial debranching of amylopectin by the drastic heating and pressure during autoclaving.

The lintnerization treatment decreased the amylose content by approximately 5 % (due to partial hydrolysis) in the three analyzed starches. The results of this study are consistent with those reported by Lawal (2004) in lintnerized malanga starches and by Wang and Wang (2001) in lintnerized potato, corn, and rice starches, who reported a decrease in amylose content during the acid treatment, relative to native starch. The H^+ ions acted mainly on the amorphous regions within the starch granule, and both amylose and amylopectin were hydrolyzed in the acid presence (Wang and Wang, 2001).

No significant differences were observed between the amylose content of the autoclaved and lintnerized corn and apple starches ($p > 0.05$), contrary to what was observed in the modified malanga starches where the lowest amylose content was presented in the lintnerization treatment. In general, we can say that unconventional-source starches differ from those obtained from conventional sources (corn) in terms of amylose content, both in their native and modified forms. It is important to mention that malanga starches (native, autoclaved, and lintnerized) presented higher percentages of amylose compared to the type of modification. Finally, amylose content has been shown to have a significant correlation with higher resistant starch content or lower digestibility (Li *et al.*, 2019).

Determination of molecular weight

Starch is a polymer consisting of a mixture of macromolecules of different chain lengths with a very similar molecular structure, so it is difficult to precisely define their molecular weight (MW) (Cai *et al.*, 2019). The native starches MW was higher than that of the modified samples (Table 1), which indicated that the macromolecules (amylose and amylopectin) were fragmented or hydrolyzed due to degradation by the applied treatments. The autoclaved starches from the three botanical sources showed a significant decrease ($p < 0.05$) in MW, with respect to their native counterparts, and this is because the autoclaved starches present a lower content of amylose compared to the native ones (Zeng *et al.*, 2015). This result is consistent with what was reported in autoclaved starch from lotus seeds and in starch subjected to ultrasonic-autoclaved treatment, where a decrease in MW was observed compared to its native starch and high-amylose corn starch (Zeng *et al.*, 2015). The starches modified by acid hydrolysis

(lintnerization) showed a significant MW decrease ($p < 0.05$) compared to the native ones; this is attributed to the fact that the amylose chains are more susceptible to acid hydrolysis instead of the amylopectin chains (Shi *et al.*, 2016).

In the initial attack that occurs in this modification, most of the amylose chains could have been hydrolyzed into shorter chains, while the amylopectin chains were less susceptible to acid attack (Xia *et al.*, 2017). The findings in this study are similar to those reported in hydrolyzed cassava (tapioca) starch at different reaction times, and those in rice starches modified by reactive extrusion through esterification with octenyl-succinylation and acetylation, and in hydrolyzed corn starches, where they presented a decrease in MW, after the chemical modifications (Cai *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2017; Ozturk *et al.*, 2011). In general, we observed that the MW between the various unconventional botanical sources (as well as their respective modifications), presented significant differences ($p \leq 0.05$) compared to the conventional source (corn), being malanga starches (native, autoclaved, and lintnerized) those that presented lower MW.

Color evaluation

Table 2 shows the color attributes of native and modified (resistant) corn, apple, and malanga starches. Color is a quality indicator criteria in the industrial and commercial use of starches, where white starches indicate a lower protein and pigment contents and, therefore, higher purity (Jan *et al.*, 2017). Therefore, it should not present any coloration for a greater acceptance of the starch (Radley, 1976). Most of the starches showed lightness values (L^*) higher than 90, so it can be considered that they presented high whiteness if it is estimated that a value of $L^* = 100$, it is white (Tirado-Gallegos *et al.*, 2016); however, AAS and AMS presented lower L^* (90.47 and 85.55, respectively) values. This result agrees with what was described by Deka and Sit (2016), where their physically modified starch presented lower luminosity values (L^*) according to its native counterpart. In starches subjected to the lintnerization treatment (LCS, LAS, and LMS), the whiteness or luminosity (L^*) was similar to the native starches (NCS, NAS, and NMS) due to the use of NaOH to neutralize the lintnerized samples, which had a whitening effect (Ashwar *et*

al., 2017). Regarding the coordinates a^* (red/green) and b^* (yellow/blue) values, AMS exhibited the highest ones (1.72 and 4.53, respectively), and AAS at coordinate b^* (5.21). These results are similar to the values reported by Deka and Sit (2016) and Aboubakar *et al.* (2008) in malanga starches. The color change observed in the autoclaved samples, could be attributed to the Maillard reaction between the starch reducing sugars and the protein amino groups during hydrothermal processing (Shah *et al.*, 2016; Gani *et al.*, 2016). In relation to the hue angle variable ($^{\circ}\text{hue}$); this has a value of 0° for red, 90° for yellow, 180° for green, and 270° for blue (Whale and Singh, 2007). The LAS presented the highest value in this variable ($^{\circ}\text{hue} \approx 281$), conferring blue tones, followed by LCS, ACS, and NCS, showing yellow tones; while the lowest values were observed in LMS (41.80), NMS (61.46) and AMS (68.36) starches, presenting red tones. These shades in the starch may be due to the presence of pigments in each botanical source used (Tirado-Gallegos *et al.*, 2016).

In the chroma variable (color saturation or intensity), no trend was observed between native and modified starches. AAS presented the highest chroma value (5.26), which was statistically significant compared to the rest of the analyzed starches, followed by AMS (4.66). In native starches, the chroma value was determined in a range of 1.33 - 3.13; these values are lower than those reported by García-Tejeda *et al.* (2011) in native banana starch (10.95); however, the chroma values evaluated in our study are higher than those obtained by Tirado-Gallegos *et al.* (2016) in apple starch (ranges 0.20 - 1.70). The autoclaved starches presented higher values (2.21 - 5.26) than the lintnerized ones (0.49 - 1.32). García-Tejeda *et al.* (2011) reported a chroma value of 5.75 for oxidized plantain starch, which is higher than those found in this study for starches chemically modified by lintnerization. Some researchers have reported that chroma values close to zero are related to the whiteness of the starch (García-Tejeda *et al.*, 2011; Tirado-Gallegos *et al.*, 2016). This result implies that the lintnerized starches of the present study are of greater whiteness than the autoclaved starches, being favorable for their industrial application since this is representative of quality and purity.

Table 2. Color variables of native, autoclaved, and lintnerized corn, from apple, and malanga starches[⊗].

Tabla 2. Variables de color de los almidones nativos, autoclaveados y lintnerizados de maíz, manzana y malanga[⊗].

Samples	Color variables				
	L^*	a^*	b^*	Chroma	$^{\circ}\text{hue}$
NCS	99.56 ± 0.01 ^a	- 1.39 ± 0.01 ^g	2.81 ± 0.00 ^c	3.13 ± 0.01 ^c	116.32 ± 0.18 ^c
ACS	97.52 ± 0.00 ^b	- 0.81 ± 0.00 ^e	2.06 ± 0.02 ^d	2.21 ± 0.01 ^d	111.40 ± 0.27 ^{cd}
LCS	99.20 ± 0.01 ^a	- 1.01 ± 0.01 ^f	- 0.49 ± 0.01 ^g	1.32 ± 0.01 ^e	139.44 ± 0.63 ^b
NMS	96.00 ± 0.33 ^c	0.63 ± 0.01 ^b	1.18 ± 0.07 ^e	1.33 ± 0.07 ^e	61.46 ± 1.42 ^f
AMS	85.55 ± 0.13 ^f	1.72 ± 0.03 ^a	4.53 ± 0.32 ^b	4.66 ± 0.13 ^b	68.36 ± 0.21 ^f
LMS	97.43 ± 0.09 ^b	0.39 ± 0.07 ^c	0.36 ± 0.07 ^f	0.53 ± 0.10 ^f	41.80 ± 3.74 ^g
NAS	96.42 ± 0.03 ^c	- 0.81 ± 0.02 ^e	2.37 ± 0.03 ^{cd}	2.51 ± 0.03 ^d	108.82 ± 0.61 ^d
AAS	90.47 ± 0.09 ^e	0.71 ± 0.00 ^b	5.21 ± 0.06 ^a	5.26 ± 0.06 ^a	82.3 ± 0.11 ^e
LAS	94.43 ± 0.09 ^d	0.09 ± 0.02 ^d	0.49 ± 0.04 ^g	0.49 ± 0.04 ^f	280.72 ± 2.39 ^a

[⊗]Mean of at least five repetitions ± standard error. Values with the same letter within columns are not significantly different according to Tukey's test ($p > 0.05$).

In general, the native and lintnerized malanga and apple starches showed differences in the color variables L^* , a^* , chroma, and °hue with the native starch and the LCS, respectively, except for the b^* coordinate; where a similar value was observed in NAS to that obtained in NCS, and LAS was similar to LCS. Regarding the autoclaved malanga and apple starches, these presented differences in L^* , a^* , b^* , chroma, and °hue with respect to ACS.

Enzymatic determinations of total starch (TS), available starch (AS), resistant starch (RS) and retrograde resistant starch (RRS)

Table 3 shows the contents (determined as a percentage from enzymatic evaluations) of total starch (TS), available starch (AS), resistant starch (RS), and retrograde resistant starch (RRS) quantified in the native and modified starch samples (lintnerized and autoclaved). The TS is considered a qualitative determination of starch purity since it represents an important criterion in its quality, while AS represents the starch susceptible to enzymatic attack (Tirado-Gallegos *et al.*, 2016). We observed that the lintnerization and autoclaving treatments decreased the TS and AS contents in all the samples analyzed, which was more significant in the corn starch sample ($\approx 5\%$). On the contrary, RS and RRS contents presented an inverse behavior to the quantified values of TS and AS since RS and RRS increased in all the samples when they were subjected to the lintnerization and autoclaving treatments. Interestingly, we observed that the highest RS amount ($\approx 14\%$) was obtained in the malanga starch sample when it was subjected to autoclaving.

Similar results in obtaining RS (by the physical treatment of autoclaving) have been reported in plantain starches, with values that increased from 1.51 % (for native starch) to 16.02 % (for autoclaved starch) (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2005), in corn starches (from 0.68 % for native starch to 8.47 %) (Neder-Suárez *et al.*, 2018), and wheat starch with values that increased from 0.3 % to 4.8 % (Berry, 1986). The RS increment can be attributed to the heating and cooling cycles made by the autoclave. Autoclaving is a treatment that combining the gelatinization process (which disrupts the granular structure by heating a starch dispersion in excess water) and the retrogradation process (which produces recrystallization of starch components) upon cooling, resulting in higher production of RS and RRS (Babu *et al.*, 2014). Similarly, in the chemical modification (lintnerization), the RS values are increased due to the depolymerization of the amylose chains and amylopectin branches; however, the lintnerization does not entirely degrade the crystalline structure (Franco *et al.*, 2002), which can produce a starch resistant to enzymatic hydrolysis (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2005). These results agree with the values recently reported by Neder-Suárez *et al.* (2018), with values that increased from 0.68 % to 2.10 % in corn starch subjected to acid hydrolysis and in lintnerized banana starch (from 1.51% to 2.61 %) (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2005). Therefore, we can infer that the non-conventional sources evaluated in our study (malanga and apple) are suitable for

obtaining resistant starch and that the greatest amount of resistant starch is obtained through the physical treatment of autoclaving compared to the chemical treatment of acid hydrolysis.

Table 3. Enzymatic determinations (%) of total starch (TS), available starch (AS), resistant starch (RS), and retrograde resistant starch (RRS) of native, autoclaved, and lintnerized corn, from apple, and malanga starches[Ⓢ].

Tabla 3. Determinaciones enzimáticas (%) de almidón total (AT), almidón disponible (AD), almidón resistente (AR) y almidón resistente retrogradado (ARR) de almidones nativos, autoclaveados y lintnerizados de maíz, manzana y malanga[Ⓢ].

Samples	TS	AS	RS	RRS
NCS	98.21 ± 0.26 ^a	95.15 ± 0.25 ^a	1.98 ± 0.03 ^b	0.80 ± 0.01 ^e
ACS	93.86 ± 0.32 ^b	84.37 ± 0.12 ^e	8.00 ± 0.05 ^c	1.10 ± 0.02 ^b
LCS	93.01 ± 0.09 ^{bc}	86.13 ± 0.04 ^c	5.69 ± 0.12 ^e	1.01 ± 0.01 ^c
NMS	91.13 ± 0.12 ^d	85.27 ± 0.05 ^d	3.24 ± 0.04 ^g	0.92 ± 0.01 ^d
AMS	89.33 ± 0.25 ^e	75.29 ± 0.11 ^g	14.45 ± 1.32 ^a	1.18 ± 0.01 ^a
LMS	88.04 ± 0.13 ^f	77.28 ± 0.07 ^f	9.27 ± 0.06 ^b	1.11 ± 0.01 ^b
NAS	93.56 ± 0.28 ^b	90.31 ± 0.15 ^b	2.17 ± 0.04 ^h	0.71 ± 0.01 ^f
AAS	92.36 ± 0.22 ^c	84.07 ± 0.04 ^e	7.28 ± 0.05 ^d	0.91 ± 0.01 ^d
LAS	90.96 ± 0.06 ^d	84.94 ± 0.04 ^d	4.85 ± 0.03 ^f	1.06 ± 0.01 ^{bc}

[Ⓢ]Mean of at least three repetitions ± standard error. Values with the same letter within columns are not significantly different according to Tukey's test ($p > 0.05$).

In vitro digestibility studies

Figure 1 shows the *in vitro* hydrolysis of native and modified corn, malanga, and apple starches. As can be seen, NCS presented the highest hydrolysis rate, in addition to a rapid increase in the percentage of starch hydrolysis (amylolysis) during the first 30 min and a subsequent decrease until reaching a value of $\approx 58\%$. In general, the hydrolysis values in all samples increased as the *in vitro* digestion time increased, which has been previously reported in cereal flours and starches such as oats (Kim and White, 2012; Zamudio-Flores *et al.*, 2015) and unconventional botanical sources such as the cowpea bean (*Vigna unguiculata*) (Ratnaningsih *et al.*, 2019). The hydrothermal modification by autoclave decreased the hydrolysis rate by ≈ 41 , 25, and 24 % for corn, malanga, and apple, respectively, compared to their native counterparts; no statistically significant differences were observed ($p \geq 0.05$) between the autoclaved starches from the different botanical sources. This type of behavior agrees with that reported by Ratnaningsih *et al.* (2019), who modified cowpea bean starch by applying successive autoclaving cycles, so these modified starches showed a lower rate of hydrolysis compared to native starch, which they associated with changes in the microstructure and increase in resistant starch obtained in the autoclaved samples.

In relation to the lintnerized samples, it was observed that the hydrochloric acid chemical treatment decreased the starch hydrolysis rate compared to the native starches in values of ≈ 21 , 5, and 3 % for the corn, malanga, and apple samples, respectively; however, this reduction was lower than the values obtained in the samples subjected to hydrothermal treatment (autoclaved). The maximum rate of hydrolysis reached by the lintnerized starches was observed

in the 37 - 39% range. These values agree with those reported by Akanbi *et al.* (2019), who modified orange sweet potato starch by lintnerization, reporting a hydrolysis rate of $\approx 35\%$.

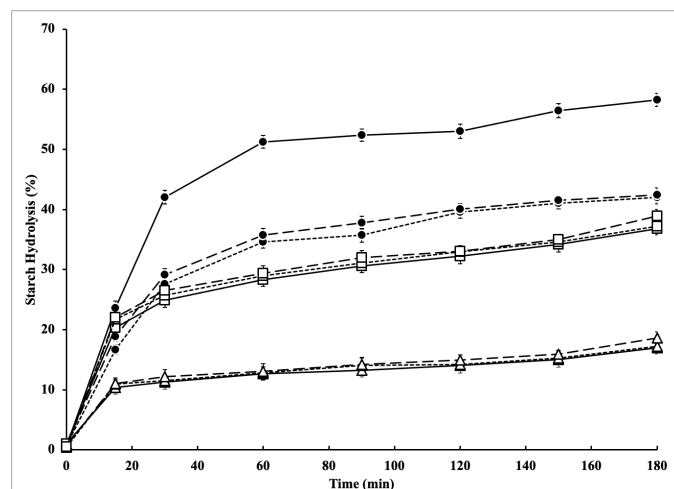


Figure 1. *In vitro* starch hydrolysis. Corn (—●—), malanga (---□---), manzana (—▲—), circles (native starches), triangles (autoclaved starches), squares (lintnerized starches). Values represent the mean of at least three replicates ($n > 3$). Bars represent the standard error of the mean.

Figura 1. Hidrólisis de almidón *in vitro*. Maíz (—●—), malanga (---□---), manzana (—▲—), círculos (almidones nativos), triángulos (almidones autoclaveados), cuadrados (almidones lintnerizados). Los valores representan la media de al menos tres réplicas ($n > 3$). Las barras representan el error estándar de la media.

CONCLUSIONS

Resistant starches type 3 (RS3) and 4 (RS4) were obtained by the application of successive cycles of autoclaving/cooling and lintnerization (acid hydrolysis), respectively, from native starches of corn (NCS), apple (NAS), and malanga (NMS). When comparing all analyzed samples, AMS had the highest RS content (14%), and NCS the lowest (1.98%). Furthermore, the autoclaved treatment decreased the enzymatic hydrolysis rate by $\approx 24 - 41\%$ compared to native starches, while with the lintnerization treatment, this reduction was smaller ($\approx 3 - 21\%$). Regarding the physicochemical properties, the autoclaved and lintnerized treatments reduced the apparent amylose content by $\approx 5\%$, producing amylose with lower molecular weight ($\approx 80 - 86$ kDa) for autoclaved starches and $\approx 92 - 101$ kDa for lintnerized starches. At the same time, the luminosity decreased by the autoclaved treatment and not by the lintnerization process. Therefore, AMS could be used in bakery applications (added in cookies or pasta) where it is desired to increase the RS content without affecting the color sensory characteristics.

ACKNOWLEDGES

The first author (VAM) thanks the "National Council of Science and Technology" (CONACYT-Mexico) for the scholarship granted to carry out his studies in the Master of Science Program at CIAD-Cuauhtemoc Unit, Chihuahua, Mexico. The authors are grateful for the support of SAGARPA-CONACYT-

Mexico for financing the project entitled: "Development of technologies for the use and exploitation of malanga corms (*Xanthosoma saggitifolium*) from the state of Chiapas and Veracruz", with code 2016-01-277457. The technical supports from engineers Arturo Ramos Martinez, Adrian Gomez Ornelas and Irma Graciela Flores Cortes are also appreciated. This study is a product of the Research Group (GI) of Carbohydrates, Packaging and Functional Foods (CEAF) of CIAD-Cuauhtemoc, Chihuahua, Mexico, led by Dr. Paul Baruk Zamudio Flores.

REFERENCES

- Abioye, V.F., Adeyemi, I.A., Akinwande, B.A., Kulakow, P. and Maziya-Dixon, B. 2017. Effect of steam cooking and storage time on the formation of resistant starch and functional properties of cassava starch. *Cogent Food and Agriculture*. 3(1): 1296401.
- Aboubakar, N.Y., Scher, J. and Mbofung, C.M.F. 2008. Physicochemical, thermal properties and microstructure of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flours and starches. *Journal of Food Engineering*. 86(2): 294-305.
- Akanbi, C.T., Kadiri, O. and Gbadamosi, S.O. 2019. Kinetics of starch digestion in native and modified sweetpotato starches from an orange fleshed cultivar. *International Journal of Biological Macromolecules*. 134: 946-953.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemist, Gaithersburg, MA, EUA.
- Aparicio-Saguilán, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., García-Suárez, F., Gutiérrez-Meraz, F. and Bello-Pérez, L.A. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: Partial characterization. *Starch/Stärke*. 57(9): 405-412.
- Ashwar, B.A., Gani, A., Shah, A. and Masoodi, F.A. 2017. Physicochemical properties, *in-vitro* digestibility and structural elucidation of RS4 from rice starch. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105: 471-477.
- Ashwar, B.A., Gani, A., Shah, A., Wani, I.A. and Masoodi, F.A. 2016a. Preparation, health benefits and applications of resistant starch—A review. *Starch-Stärke*. 68(3-4): 287-301.
- Ashwar, B.A., Gani, A., Wani, I.A., Shah, A., Masoodi, F.A. and Saxena, D.C. 2016b. Production of resistant starch from rice by dual autoclaving-retrogradation treatment: *In vitro* digestibility, thermal and structural characterization. *Food Hydrocolloids*. 56: 108-117.
- Ashwar, B.A., Gani, A., Wani, I.A., Shah, A., Masoodi, F.A. and Saxena, D.C. 2016c. Production of resistant starch from rice by dual autoclaving-retrogradation treatment: *In vitro* digestibility, thermal and structural characterization. *Food Hydrocolloids*. 56: 108-117.
- Babu, A.S., Mahalakshmi, M. and Parimalavalli, R. 2014. Comparative study on properties of banana flour, starch and autoclaved starch. *Trends in Carbohydrate Research*. 6(1): 38-44.
- Berry, C.S. 1986. Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amyolytic enzymes during the determination of dietary fiber. *Journal of Cereal Science*. 4(4): 301-314.
- Bustillos-Rodríguez, J.C., Ordóñez-García, M., Tirado-Gallagos, J.M., Zamudio-Flores, P.B., Ornelas-Paz, J. de J., Acosta-Muñiz,

- C.H., Gallegos-Morales, G., Sepúlveda-Ahumada, D.R., Salas-Marina, M.A., Berlanga-Reyes, D.I., Aparicio-Saguilán, A. and Rios-Velasco, C. 2019. Physicochemical, thermal and rheological properties of native and oxidized starch from corn landraces and hybrids. *Food Biophysics*. 14: 182-192.
- Bustillos-Rodríguez, J.C., Tirado-Gallegos, J.M., Ordoñez-García, M., Zamudio-Flores, P.B., Ornelas-Paz, J. de J., Acosta-Muñiz, C.H. and Rios-Velasco, C. 2018. Physicochemical, thermal and rheological properties of three native corn starches. *Food Science and Technology*. 39(1): 149-157.
- Cai, C., Wei, B., Tian, Y., Ma, R., Chen, L., Qiu, L. and Jin, Z. 2019. Structural changes of chemically modified rice starch by one-step reactive extrusion. *Food Chemistry*. 288: 354-360.
- Chiu, C. and Solarek, D. 2009. Modification of Starches. In: BeMiller, J. and Whistler, R. (Eds.).
- Dai, L., Qiu, C., Xiong, L. and Sun, Q. 2015. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. *Food Chemistry*. 174: 82-88.
- Deka, D. and Sit, N. 2016. Dual modification of taro starch by microwave and other heat moisture treatments. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92: 416-422.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M. and Cummings, J.H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. 46: S33-50.
- Espinosa-Solis, V., Zamudio-Flores, P.B., Espino-Díaz, M., Vela-Gutiérrez, G., Rendón-Villalobos, J.R., Hernández-González, M., Hernández-Centeno, F., López-De la Peña, H.Y., Salgado-Delgado, R., and Ortega-Ortega, A. 2021. Physicochemical characterization of resistant starch type-III (RS3) obtained by autoclaving malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) flour and corn starch. *Molecules*. 26. 4006.
- Fox, E., Shotton, K. and Ulrich, C. 1995. Sigma-Stat: Manual del usuario, versión 2.1 para Windows 95 NT y 3.1. Editorial Jandel Scientific Co., EUA.
- Franco, C.M., Cabral, R.A. and Tavares, D.Q. 2002. Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. *Starch-Stärke*. 54(10): 469-475.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E. and Pérez-Álvarez, J.A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*. 43(4): 931-942.
- Gani, A., Jan, A., Shah, A., Masoodi, F.A., Ahmad, M., Ashwar, B.A. and Wani, I.A. 2016. Physico-chemical, functional and structural properties of RS3/RS4 from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*. 87: 514-521.
- García-Tejeda, Y.V., Zamudio-Flores, P.B., Bello-Pérez, L.A., Romero-Bastida, C.A. and Solorza-Feria, J. 2011. Oxidación del almidón nativo de plátano para su uso potencial en la fabricación de materiales de empaque biodegradables: Caracterización física, química, térmica y morfológica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 12(3): 125-135.
- Goñi, I., García-Alonso, A. and Saura-Calixto, F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutritional Research*. 17: 427-437.
- Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E. and Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: A method for foods and food products. *Food Chemistry*. 56(4): 445-449.
- Holm, J., Hagander, B., Björck, I., Eliasson, A.C. and Lundquist, I. 1989. The effect of various thermal processes on the glycemic response to whole grain wheat products in humans and rats. *The Journal of Nutrition*. 119(11): 1631-1638.
- Jan, K.N., Panesar, P.S. and Singh, S. 2017. Process standardization for isolation of quinoa starch and its characterization in comparison with other starches. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11(4): 1919-1927.
- Jane, J-L., Chen, M., Lee, L., McPherson, A., Wong, K-S., Radosavljevic, M. and Kasemsuwan, T. 1999. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*. 76(5): 629-637.
- Juarez-Enriquez, E., Olivas, G.I., Ortega-Rivas, E., Zamudio-Flores, P.B., Perez-Vega, S., Sepulveda, D.R. 2019. Water activity, not moisture content, explains the influence of water on powder flowability. *LWT*. 100: 35-39,
- Kim, H.J. and White, P.J. 2012. *In vitro* digestion rate and estimated glycemic index of oat flours from typical and high β -glucan oat lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5237-5242.
- Kringel, D.H., Dias, A.R.G., Zavareze, E.D.R. and Gandra, E.A. 2020. Fruit wastes as promising sources of starch: Extraction, properties, and applications. *Starch-Stärke*. 72(3-4): 1900200.
- Kwon, C., Kim, H.R., Moon, T.W., Lee, S.H. and Lee, C.J. 2019. Structural and physicochemical characteristics of granular malic acid-treated sweet potato starch containing heat-stable resistant starch. *Journal of Chemistry*. 2903252: 10.
- Lawal, O.S. 2004. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidised, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. *Food Chemistry*. 87(2): 205-218.
- Li, H., Gidley, M.J. and Dhital, S. 2019. Almidones de alto contenido de amilosa para cerrar la "brecha de la fibra": Desarrollo, estructura y funcionalidad nutricional. Revisión completa en Ciencia de Alimentos e Inocuidad de Alimentos. 18(2): 362-379.
- Li, L., Yuan, T.Z. and Ai, Y. 2020. Development, structure and *in vitro* digestibility of type 3 resistant starch from acid-thinned and debranched pea and normal maize starches. *Food Chemistry*. 126485.
- Ma, Z. and Boye, J.I. 2018. Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(7): 1059-1083.
- Neder-Suárez, D., Amaya-Guerra, C.A., Báez-González, J.G., Quintero-Ramos, A., Aguilar-Palazuelos, E., Galicia-García, T., Ramírez-Wong, B., Campos-Venegas, K. and Zazueta-Morales, J. de J. 2018. Resistant starch formation from corn starch by combining acid hydrolysis with extrusion cooking and hydrothermal storage. *Starch-Stärke*. 70(5-6): 1700118.
- Obadi, M., Li, C., Li, Q., Li, X., Qi, Y. and Xu, B. 2020. Relationship between starch fine structures and cooked wheat starch digestibility. *Journal of Cereal Science*. 95: 103047.
- Ojinnaka, M.C., Akobundu, E.N.T. and Iwe, M.O. 2009. Cocoyam starch modification effects on functional, sensory and cookies qualities. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(5): 558-567.
- Ozturk, S., Koxsel, H. and Ng, P.K. 2011. Production of resistant starch from acid-modified amylopectin starches with enhanced functional properties. *Journal of Food Engineering*. 103(2): 156-164.

- Punia, S., Siroha, A.K., Sandhu, K.S. and Kaur, M. 2019. Rheological behavior of wheat starch and barley resistant starch (type IV) blends and their starch noodles making potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. 130: 595-604.
- Radley, J.A. 1976. *Starch production technology*. London: Applied Science Publishers Ltd. 214 p.
- Ratnaningsih, N., Harmayani, E., and Marsono, Y. 2019. Physicochemical properties, *in vitro* starch digestibility, and estimated glycemic index of resistant starch from cowpea (*Vigna unguiculata*) starch by autoclaving-cooling cycles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1-40.
- Raungrusmee, S. and Anal, A.K. 2019. Effects of lintnerization, autoclaving, and freeze-thaw treatments on resistant starch formation and functional properties of pathumthani 80 rice starch. *Foods*. 8(11): 558.
- Regand, A., Chowdhury, Z., Tosh, S.M., Wolever, T.M.S. and Wood, P. 2011. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. *Food Chemistry*. 129: 297-304.
- Rivas-González, M., Méndez-Montealvo, M.G.C., Sánchez-Rivera, M.M., Núñez-Santiago, M.C. and Bello-Pérez, L.A. 2008. Morphological molecular and physicochemical characterization of oxidized and lintnerized banana starch. *Agrociencia*. 42(5): 487-497.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L. and Mañas, E. 1993. Resistant starch in foods: Modified method for dietary fiber residues. *Journal of Food Science*. 58(3): 642-643.
- Shah, A., Masoodi, F.A., Gani, A. and Ashwar, B.A. 2016. *In-vitro* digestibility, rheology, structure, and functionality of RS3 from oat starch. *Food Chemistry*. 212: 749-758.
- Shi, M., Wang, K., Yu, S., Gilbert, R.G. and Gao, Q. 2016. Structural characterizations and *in vitro* digestibility of acid-treated wrinkled and smooth pea starch (*Pisum sativum* L.). *Starch-Stärke*. 68(7-8): 762-770.
- Simsek, S. and El, S.N. 2012. Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm and determination of its effects on health by *in vitro* methods. *Carbohydrate Polymers*. 90(3): 1204-1209.
- Stevenson, D.G., Domoto, P.A. and Jane, J.L. 2006. Structures and functional properties of apple (*Malus domestica* Borkh) fruit starch. *Carbohydrate Polymers*. 63(3): 432-441.
- Tirado-Gallegos, J.M., Zamudio-Flores, P.B., Ornelas-Paz, J. de J., Rios-Velasco, C., Acosta-Muñiz, C.H., Gutiérrez-Meraz, F., Islas-Hernández, J.J. and Salgado-Delgado, R. 2016. Efecto del método de aislamiento y el estado de madurez en las propiedades fisicoquímicas, estructurales y reológicas de almidón de manzana. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(2): 391-408.
- Torruco-Uco, J.G., Chávez-Murillo, C.E., Hernández-Centeno, F., Salgado-Delgado, R., Tirado-Gallegos, J.M. and Zamudio-Flores, P.B. 2016. Use of high-performance size-exclusion chromatography for characterization of amylose isolated from diverse botanical sources. *International Journal of Food Properties*. 19(6): 1362-1369.
- Van Hung, P., Vien, N.L. and Phi, N.T.L. 2016. Resistant starch improvement of rice starches under a combination of acid and heat-moisture treatments. *Food Chemistry*. 191: 67-73.
- Vargas, G., Martínez, P. and Velezmoro, C. 2016. Propiedades funcionales de almidón de papa (*Solanum tuberosum*) y su modificación química por acetilación. *Scientia Agropecuaria*. 7: 223-230.
- Walpole, E.R., Myers, H.R. and Myers, L.S. 1999. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., México.
- Wang, L. and Wang, Y.J. 2001. Structures and physicochemical properties of acid-thinned corn, potato and rice starches. *Starch-Stärke*. 53(11): 570-576.
- Waterschoot, J., Gomand, S.V., Fierens, E. and Delcour, J.A. 2015. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch/Stärke*. 67(1-2): 14-29.
- Whale, S.K. and Singh, Z. 2007. Endogenous ethylene and color development in the skin of 'Pink Lady' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132(1): 20-28.
- Xia, H., Li, B.Z. and Gao, Q. 2017. Effect of molecular weight of starch on the properties of cassava starch microspheres prepared in aqueous two-phase system. *Carbohydrate Polymers*. 177: 334-340.
- Zamudio-Flores, P.B., Tirado-Gallegos, J.M., Monter-Mirando, J.G., Aparicio-Saguilán, A., Torruco-Uco, J.G., Salgado-Delgado, R. and Bello-Pérez, L.A. 2015. *In vitro* digestibility and thermal, morphological and functional properties of flours and oat starches of different varieties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(1): 81-97.
- Zeng, S., Wu, X., Lin, S., Zeng, H., Lu, X., Zhang, Y. and Zheng, B. 2015. Structural characteristics and physicochemical properties of lotus seed resistant starch prepared by different methods. *Food Chemistry*. 186: 213-222.

Effect of processing conditions on the functional properties of aquafaba from natural chickpeas: valorization of a food waste

Efecto de las condiciones de procesamiento sobre las propiedades funcionales de la aquafaba de garbanzos naturales: valorización de un residuo alimentario

Angelica Thomas-Meda^a, Gilber Vela-Gutiérrez^a, Olga Luisa Tavano^b, Veymar G. Tacias-Pascacio^{a, *}

^a Faculty of Nutrition and Food Sciences, University of Sciences and Arts of Chiapas, Lib. Norte Pte. 1150, 29039 Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico.

^b Faculty of Nutrition, Alfenas Federal Univ., 700 Gabriel Monteiro da Silva St, Alfenas, MG 37130-000, Brazil

ABSTRACT

Chickpea cooking water (aquafaba) is currently being widely investigated as an egg substitute due to its excellent functional properties, which can vary for various reasons, including processing conditions employed during canning. There is little information regarding the behavior of such properties in aquafaba obtained from natural chickpeas (not canned). For this reason, the objective of this paper was to study the effect of operational conditions on foam capacity (FC) and stability (FS) of aquafaba from natural chickpeas. Different ranges of cooking time, temperature, and chickpea to water ratio were evaluated. The results were compared with the FC and FS of egg white and canned aquafaba. It was found that a chickpea to water ratio of 1:2, cooking temperature of 98 ± 2 °C and cooking time of 60 min, generated aquafaba with a FC and FS of 370 ± 14.14 % and 82.78 ± 3.1 %, respectively. The obtained aquafaba presented a lower FC and FS than egg white and lower FC and similar FS than canned aquafaba. Obtaining aquafaba for use in the food industry is aligned with current efforts to recover food waste.

Key words: egg replacer, foam capacity, foam stability, chickpeas

RESUMEN

El agua de cocción de garbanzos (aquafaba) se está investigando ampliamente como sustituto del huevo debido a sus excelentes propiedades funcionales que varían por diversas razones, incluidas las condiciones de procesamiento empleadas durante el enlatado. Hay poca información sobre el comportamiento de tales propiedades en aquafaba obtenida de garbanzos naturales (no enlatados). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las condiciones de operación sobre la capacidad de formación (FC) y la estabilidad (FS) de espuma de aquafaba a partir de garbanzos naturales. Se evaluaron diferentes rangos de tiempo y temperatura de cocción y relación garbanzo/agua. Los resultados se compararon con la FC y FS de clara de huevo y aquafaba enlatada. Se encontró que una relación garbanzo:agua de 1:2, temperatura de cocción de 98 ± 2 °C y tiempo de cocción de 60 min, generan aquafaba con FC y FS de 370

± 14.14 % y 82.78 ± 3.1 %, respectivamente. El aquafaba obtenida presentó FC y FS inferiores a la clara de huevo y FC inferior y FS similar que la aquafaba enlatada. La obtención de aquafaba para su uso en la industria alimentaria, se alinea con los esfuerzos actuales de valorización de desperdicios alimentarios.

Palabras clave: sustituto de huevo, capacidad de espuma, estabilidad de espuma, garbanzos

INTRODUCTION

Proteins are compounds which are of special interest for food industry due to their bioactive, nutritional and functional properties (Lafarga *et al.*, 2019a). Proteins from animal sources have been traditionally used in the food industry to obtain edible foams and emulsions; however, it is known that 6 kg of vegetable protein are required to produce 1 kg of animal protein, which has led to large-scale animal protein production being considered one of the main causes of environmental problems (Aiking, 2014; Lafarga *et al.*, 2019a). Among animal proteins, egg white proteins are extensively used due to their excellent functional properties such as foam formation, emulsification and stabilization (Herald *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2017; Aslan and Ertaş, 2020); however, these proteins are strongly associated with food allergies, especially in young children and infants (Caubet and Wang, 2011; Park *et al.*, 2017; Meurer *et al.*, 2020; Alsalman *et al.*, 2020a; Włodarczyk *et al.*, 2022). In addition to egg allergy, the increased awareness of healthiness and sustainability of the modern consumer and food industry, together with an increase in the proportion of vegan people (Arozarena *et al.*, 2001; Boye *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2016; Asioli *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; McClements *et al.*, 2017; Sharif *et al.*, 2018; Aschemann-Witzel and Peschel, 2019; Buhl *et al.*, 2019;), have motivated a growing interest for plant-based proteins, mainly of soy, peas and chickpeas, as possible candidates to replace animal-based proteins (Sharif *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022), because they have functional properties such as water holding capacity, fat binding, solubility as well as foaming, gelling, and emulsifying capacities, which are comparable with proteins from animal and dairy sources (Boye *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2016; Sharif *et al.*, 2018; Sharima-Abdullah *et*

al., 2018; Bessada *et al.*, 2019), but with the advantages of low allergenicity, sustainable production, high production volumes and low price (Papalamprou *et al.*, 2010; Gumus *et al.*, 2017; Buhl *et al.*, 2019; Lafarga *et al.*, 2019a).

Recently, it was discovered that aquafaba, the viscous liquid resulting from cooking chickpea seed or other legumes in water, or that found in canned products of the same origin (Mustafa and Reaney, 2020; Aslan and Ertaş, 2021), is a valuable food resource due to its high content in protein and health-promoting compounds such as saponins and polyphenols (Damian *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018; Lafarga *et al.*, 2019a; Lafarga *et al.*, 2019b). Aquafaba from chickpeas has been gaining popularity since 2014 due to its having showed to be a useful thickener, emulsifier and foaming agent in various formulations such as mayonnaise, meringues, cheeses and cakes (He *et al.*, 2019; Alsalman *et al.*, 2020a; Meurer *et al.*, 2020; Raikos *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021b; Muhialdin *et al.*, 2021; Nguyen and Tran, 2021).

It has been reported that aquafaba contains approximately 94 % of water, 1.5 % of protein, 0.5 % of ash and 4 % of carbohydrates (Mustafa *et al.*, 2018; Serventi *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2018; Stantiall *et al.*, 2018; Alsalman *et al.*, 2020b); however, the chemical composition and functional properties of aquafaba, can vary depending on factors such as chickpea composition and genotype, processing methods, processing auxiliary agents (Mustafa and Reaney, 2020) and operational conditions.

Based on the aforementioned, the objective of this paper was to study the effect of operational conditions (cooking temperature, cooking time and solid to liquid ratio) on functional (foam capacity and stability) properties of aquafaba from natural chickpea. In addition, the functional properties of the aquafaba obtained were compared against egg white proteins and canned aquafaba properties.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dried Mexican Kabuli chickpeas were purchased from a local supermarket located in the city of Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (México). Chickpeas were stored at room temperature until their use. Canned Kabuli chickpeas and fresh egg whites were also purchased from the same store and were used for comparison.

Raw material pretreatment

Chickpeas were subjected to a manual cleaning and washing in order to remove some impurities such as stones, insects and rotten grains. After that, clean chickpeas were soaked in tap water for 24 h at a chickpeas to water ratio of 1:2 (w/v). Then, soaking water was drained and discarded, and the chickpeas obtained were used in the next experiments.

Aquafaba production

One hundred grams of cleaned and soaked chickpeas were placed in a sealed glass jar, then mixed with distilled water at different chickpeas to water ratios (CWR) and cooked for di-

fferent times and temperatures according to the monofactor test experiments. After cooking, the aquafaba obtained was drained from cooked chickpea grains using a stainless-steel strainer, and then stored under refrigeration at 4 °C for 24 h. Prior to analysis the aquafaba was allowed to cool down to room temperature. Aquafaba was analyzed in terms of its foaming capacity and foam stability, and compared with canned samples.

Monofactor test

In order to study the effect of operational conditions on functional properties of aquafaba, cooking temperature, cooking time and CWR were evaluated by monofactor test. In this sense, two variables were kept constant at their respective central test range values and the other variable varied within its experimental ranges. The variables studied were cooking temperature (60 to 98 ± 2 °C), cooking time (20-100 min) and CWR (1:1 to 1:5). All experiments were performed in triplicate.

Foaming capacity and foam stability

Foaming capacity (FC) and foam stability (FS) were determined according to Shim *et al.* (2018); briefly, 50 mL of sample (natural aquafaba, canned aquafaba or egg white) was placed in a 14 cm diameter bowl. The sample was shaken at maximum speed with a Hamilton Beach hand mixer (model 62647), for 2 min. After that, the obtained foam was placed in a 500 mL graduate cylinder. Measurements of the foam volumes of the whipped samples were made at time 0 (V_{F0}) and after 30 min (V_{F30}), and the FC and FS were calculated according to the equations (1) and (2), respectively (Mustafa *et al.*, 2018).

$$\%FC = \frac{V_{F0}}{V_{sample}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%FS = \frac{V_{F30}}{V_{F0}} \times 100 \quad (2)$$

Analysis of the aquafaba physicochemical properties

Aquafaba was analyzed in terms of the following physicochemical properties. pH (981.12) and density (962.37) were determined according to AOAC standard methods (AOAC, 1990). Protein concentration was determined by the Bradford dye binding method, using bovine serum albumin as the reference and recording the absorbance at 595 nm (Bradford, 1976). Starch content was measured qualitatively by Starch-Iodine Complex method reported by Street (1974); the sample was allowed to act on an amylose solution for 15 min, and then the blue color formed by adding iodine-iodide solution was compared with the color of an amylase free control, using a spectrophotometer at 578 nm (Street, 1974).

Determination of total polyphenol content

Total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method, performed as described by Lu *et al.* (2018). One mL of Folin-Ciocalteu reagent was added into 0.3 mL of polyphenol solution and mixed for 5 min. Then, 5 mL of

sodium carbonate (10 %) was added and oscillated for 3 min. After that, 20 mL of distilled water were added, and the mixture was incubated at room temperature for 2 h. Finally, absorbance of the solution was measured at 765 nm using an ultraviolet-visible spectrophotometer (VE-5100UV, Científica Vela Quin, México). Gallic acid was used as standard.

Antioxidant activity measured by ABTS method

Antioxidant activity was determined by ABTS [(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] method according to the reported by Cai *et al.* (2015). Briefly, potassium persulphate (2.45 mM) and ABTS stock solution (7 mM) were mixed and left in the dark at room temperature for 16 h, to produce the ABTS radical cation. Prior to the analysis, the ABTS radical solution was diluted in 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) to an absorbance of 0.8 ± 0.1 at 734 nm. After that, 1 mL of diluted ABTS radical solution and 1 mL of sample were mixed, and ten minutes later the absorbance was measured at 734 nm against the corresponding blank, and using TROLOX (Sigma Aldrich) as standard. The ABTS scavenging activity of samples was calculated using equation 3 (Cai *et al.*, 2015).

$$ABTS \text{ scavenging activity (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3)$$

where A_1 is the absorbance of the control and A_2 is the absorbance of the sample.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Minitab® statistical software version 16.0 for windows. Mean comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $p < 0.05$. All experiments were performed in triplicate and data are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of processing conditions on functional properties of aquafaba

The effect of the variables cooking temperature, cooking time and CWR on functional properties of aquafaba (foaming capacity and foam stability) from natural chickpeas were studied by monofactor test. Chickpeas to water ratio (w/v) was studied in a range from 1:1 to 1:5; in this case, the variables cooking temperature and cooking time were maintained at 98 ± 2 °C and 60 min, respectively. As it can be seen in Figure 1(a), the best CWR for both foaming capacity and foam stability was 1:2, while an increase in the amount of water negatively affected the functional properties of the aquafaba. Similar results were obtained by Serventi *et al.* (2018), who boiled chickpeas seed in water with 1:1.75 of chickpeas to water ratio for 90 min (Serventi *et al.*, 2018). This can be due to that an excessive amount of water in mixture from higher ratios (1:4 and 1:5, mainly) which would inevitably lower the concentration of proteins and carbohydrates, that are the main responsables for the aquafaba functional properties (Mustafa *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2018). In fact, a negative

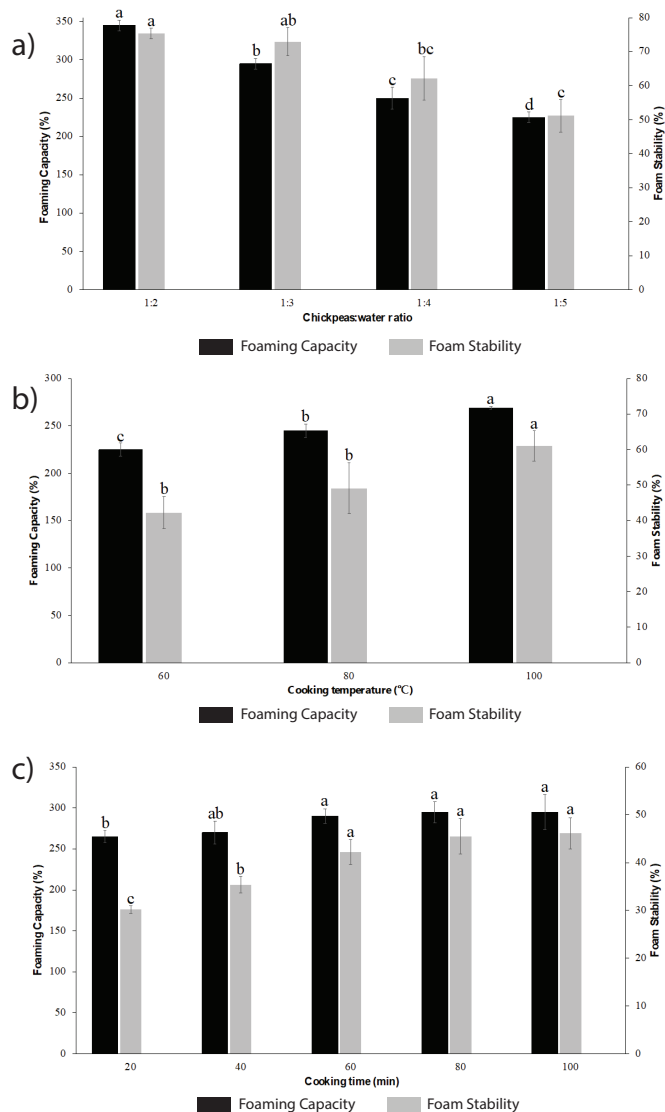


Figure 1. Effect of variables a) chickpeas to water ratio, b) cooking temperature and c) cooking time on foaming capacity and stability of aquafaba. Results were expressed as the mean value \pm standard deviation. Different letters between treatments indicate statistical significant differences ($p < 0.05$).

Figura 1. Efecto de las variables a) relación garbanzos:agua, b) temperatura de cocción y c) tiempo de cocción sobre la capacidad y estabilidad de espuma de aquafaba. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

correlation between CWR and protein concentration was reported, indicating that the protein content of the aquafaba obtained boiling the chickpeas at a lower CWR had a higher protein concentration (Lafarga *et al.*, 2019a). The foaming ability of most plant proteins increases with low degrees of hydrolysis and high concentrations of proteins in solution. As demonstrated by Patino *et al.* (2008), this ability tends to a maximum when the air–water interface is saturated by the protein (Patino *et al.*, 2008).

The results of the effect of the cooking temperature on the functional properties of aquafaba are presented in Figure

1(b). In this case, the CWR and the cooking time were kept at 1:2 and 60 min, respectively. As can be seen in Figure 1(b), temperature plays an important role in the foam capacity and foam stability of the aquafaba. An increase in the value of this variable from 60 °C to 98 ± 2 °C, improves the functional properties of the product. This behavior can be explained taking into account that high temperature treatment during cooking leads to hydration and denaturation of proteins, gelatinization of starch, solubilization, depolymerization and/or loss of pectic polysaccharides from the cell wall. Therefore, during cooking, the outer cell layers of the seed coat become a selective membrane that controls the diffusion of molecules from the seed to the cooking water; thus, exposure to higher temperatures can cause disruption of the seed coat and greater transfer of undissolved materials to the cooking water, giving it better functional properties (He *et al.*, 2021a).

Figure 1(c) shows the results for cooking time; this variable was studied in a range from 20 to 100 min, where CWR and cooking temperature were maintained at 1:2 and 98 ± 2 °C, respectively. As it can be observed, an increase in FC and FS was found when the cooking time increased from 20 to 60 min; however, after this time functional property values were not significantly improved. This may be due to the fact that in 60 min the greatest possible quantity (under the evaluated conditions) of compounds of interest that confer its functional properties to aquafaba have been leached from the chickpea to the cooking water, so prolonging cooking time does not promote the release of more compounds. In addition, it has been reported that, in general, long cooking times can cause protein denaturation, and thereby affect the functional properties of aquafaba (He *et al.*, 2021a).

Based on the results of monofactor tests, the conditions selected for the production of aquafaba were CWR of 1:2, cooking temperature of 98 ± 2 °C and cooking time of 60 min. The aquafaba produced under these conditions presented a foaming capacity and stability of 370 ± 14.14 % and 82.78 ± 3.1 %, respectively, which is very close to the reported by Mustafa *et al.* (2018), who found a foaming capacity and stability ranged between 182 to 476 % and 77 to 92 %, respectively (Mustafa *et al.*, 2018). Functional properties of natural aquafaba were compared with the functional properties of canned aquafaba and egg white, as it can be seen in Figure 2. As expected, the egg white presents the best functional properties (foam capacity and stability) due to its proteins, such as ovalbumin, ovotransferrin, lysozym, ovomucoid, and ovomucin, and their interactions with each other that are particularly capable of keeping the foam formed (Bovšková and Míková, 2011). These results are in accordance with Buhl *et al.* (2022) and Stantiall *et al.* (2018), who find that foam prepared by fresh egg has significant higher foam capacity than natural aquafaba of chickpeas.

In the case of the aquafaba produced in this work (natural aquafaba) compared to the canned aquafaba, it was found that the latter has a better foam capacity; this can be explained considering the differences in industrial canning procedures (cooking conditions such as pressure, tempera-

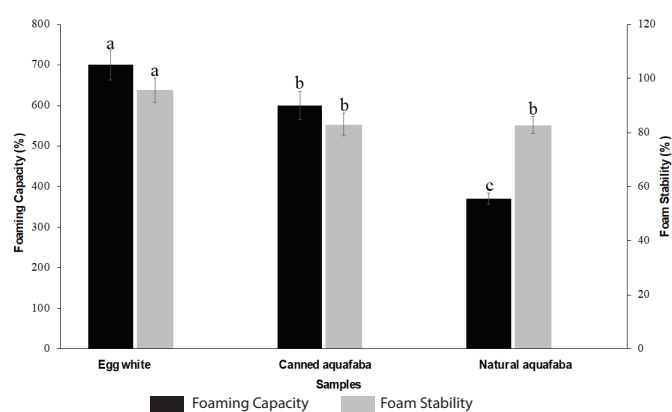


Figure 2. Comparison of the functional properties of aquafaba obtained from natural chickpeas, canned aquafaba and egg white. Results were expressed as the mean value \pm standard deviation. Different letters between treatments indicate statistical significant differences ($p < 0.05$).

Figura 2. Comparación de las propiedades funcionales de aquafaba obtenida a partir de garbanzos naturales, aquafaba enlatada y clara de huevo. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

ture, time, etc.) (He *et al.*, 2021c; Alsaman and Ramaswamy, 2021; Alsaman *et al.*, 2022), the use of additives, such as salt and preservatives, and genetic differences among cultivars used by manufacturers which can result in changes in aquafaba composition and its functional properties (Mustafa *et al.*, 2018). Interestingly, no statistically significant differences ($p > 0.05$) were found between foam stability of natural aquafaba and canned aquafaba. This may be due to the fact that both natural aquafaba and canned aquafaba have a similar content of protein (albumins, mainly) (Mustafa *et al.*, 2018; Buhl *et al.*, 2019) (as it can be seen in Table 1), which are surface-active agent (Shim *et al.*, 2018) and that they were whipped for the same time. Whipping of this protein solution promotes the incorporation of air into the solution, which leads to bubble formation and adsorption of proteins at the gas-liquid interface to form protein-encapsulated bubbles. The shear force involved in whipping causes denaturation and coagulation of proteins on the air cell surfaces, increasing foam rigidity and stability (Mustafa *et al.*, 2018). Similar results were reported by Mustafa *et al.* (2018), who studied aquafaba from different brands of canned chickpeas. Among their results, they found that, for example, brands A and B presented a foam capacity of 182.22 and 288.89 %, respectively, with a statistically significant difference between them; however, for foam stability, these aquafaba presented values of 77.2 and 77.5 %, for A and B, respectively, without significant statistical differences.

Analysis of the aquafaba

The natural aquafaba prepared in this work and the aquafaba from canned chickpeas were compared in terms of some of their physicochemical properties. As it can be seen in Table 1, no statistically significant differences ($p > 0.05$) were found in protein content between natural aquafaba and canned aquafaba, and these results are consistent with the findings

Table 1. Physicochemical properties of natural aquafaba produced in this study in comparison with canned aquafaba.**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de la aquafaba natural producida en este estudio en comparación con la aquafaba enlatada.

Property	Natural Aquafaba	Canned Aquafaba
Density (g/mL)	1.28 ± 0.29 ^a	1.33 ± 0.13 ^a
Starch	Yes	ND*
pH	5.17 ± 0.25 ^b	5.85 ± 0.11 ^a
Protein content (mg/mL)	0.93 ± 0.19 ^a	1.11 ± 0.16 ^a
Antioxidant activity (%)	27.57 ± 0.64 ^a	23.78 ± 0.42 ^b
Total polyphenols content (mg GA/g)	1.68 ± 0.0007 ^a	0.84 ± 0.0005 ^b

*Not detectable

Different letters in the same row indicate statistical significant differences ($p < 0.05$).

of Włodarczyk *et al.* (2022), Buhl *et al.* (2019), Mustafa *et al.* (2018) and Stantiall *et al.* (2018), who reported a protein concentration of 1.26, 1.3, 1.5 and 0.95 % of aquafaba, respectively. As mentioned above, the similar protein content between natural aquafaba and canned aquafaba could explain the similar behavior in the stability of the foam formed by both samples of aquafaba. Similarly, no significant statistical differences ($p > 0.05$) were found between the density values of the two samples studied, and such values are similar to those reported by Mustafa *et al.* (2018).

On the other hand, concerning starch, no presence of this compound was found in canned aquafaba, a result that is consistent with other reports (Damian *et al.*, 2018; Stantiall *et al.*, 2018). However, in natural aquafaba the presence of starch was found, and this may be due to less drastic processing conditions than those used in other studies, such as the use of high pressures, which together with a high temperature, can lead to degradation of this polysaccharide (Guha and Zakiuddin, 2002). Regarding the pH, it was found that the canned aquafaba presented a higher pH (5.85) than natural aquafaba (5.15) obtained in this work, which may be due, as previously mentioned, to the various differences in cooking time, cooking temperature, addition of salts and preservatives, pressure during cooking, chickpea cultivar and genotype, chickpea to water ratio (He *et al.*, 2021a; Erem *et al.*, 2021). It is important to mention that, the differences in pH between both samples can explain the different foam capacities found in them, which, as already shown in the corresponding section, was higher in canned aquafaba than in natural aquafaba, and this is due to the fact that pH had a negative effect on foaming capacity, that is, an increase in this parameter will cause a decrease on foaming capacity. This is because the pH modifies the net charge of the protein, which affects foam formation and, in general, its viscoelastic properties (Lafarga *et al.*, 2019a).

Finally, the antioxidant activity and total phenol content of natural aquafaba was statistically higher than that of canned aquafaba ($p > 0.05$), and this may be due to the conditions and processing steps used in the canned aquafaba

affecting these properties to a greater extent. It has been reported that the canning procedure includes soaking (25 °C 12 h), bleaching (85 °C 30 min), canning in salt water (1.3 % salt and 1.6 % sugar) and final heating (121 °C 14 min) (Erem *et al.*, 2021), which is different from the process used in this work. In addition, it is important to note that, although there are about twice as many polyphenolic compounds in natural aquafaba compared to canned aquafaba, in both cases the levels are low. This can be favorable for the physicochemical properties of the material. The presence of phenolic compounds solubilized in aquafaba, although it can add bio-functional properties, can reduce the foaming properties of the proteins present. This is because the ability of proteins to interact with the aqueous interface can be reduced when blocked by phenolic compounds that preferentially integrate with them, as observed by Fernando and Manthey (2002) in an assay with black bean soluble components (Fernando and Manthey, 2022).

CONCLUSION

The functional properties of the aquafaba produced from natural chickpeas are influenced by the process variables, in such a way that the increase in temperature and cooking time and the decrease in the CWR increase both the capacity and the foam stability. In this way, it is possible to find operating conditions that generate aquafaba with functional properties similar to that of canned aquafaba, and with the potential, through optimization of operating conditions, to be compared with the functional properties of egg white. In addition, regardless of whether it is aquafaba produced from natural chickpeas or canned aquafaba, this product presents antioxidant activity derived from the presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds, which are extremely valuable in various industries.

This study reinforced the need to add value to grain cooking water, previously seen as a waste material, but which may contain bio-functional value and be of great interest in the technological aspect of its application. The production conditions of natural aquafaba, that is, obtained by boiling the grains and not draining the can, allowed us to conclude that this material can be obtained in an accessible and applicable way, both industrially and at home. Its production, as demonstrated here, is simple and does not require the incorporation of other ingredients. While it may have a slight foaming disadvantage compared to egg whites, the data indicate that aquafaba as a vegan food option holds real promise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors deeply thank Dr. Angel Berenguer-Murcia for his valuable support in correcting the language in this work.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest of any kind.

REFERENCES

- Aiking, H. 2014. Protein production: planet, profit, plus people?. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 100: 483S–489S.
- Alsaman, F. B., Al-Ruwaih, N., Al-Attar, H. y Mulla, M. Z. 2022. Effect of high pressure processing on structural and functional properties of canned aquafaba. *Food Science and Biotechnology*. 31: 1157–1167.
- Alsaman, F. B. y Ramaswamy, H. S. 2021. Evaluation of changes in protein quality of high-pressure treated aqueous aquafaba. *Molecules*. 26: 234.
- Alsaman, F. B., Tulbek, M., Nickerson, M. y Ramaswamy, H. S. 2020a. Evaluation and optimization of functional and antinutritional properties of aquafaba. *Legume Science*. 2: e30.
- Alsaman, F. B., Tulbek, M., Nickerson, M. y Ramaswamy, H. S. 2020b. Evaluation of factors affecting aquafaba rheological and thermal properties. *LWT*. 132: 109831.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Arozarena, I., Bertholo, H., Empis, J., Bungler, A. y Sousa, I. 2001. Study of the total replacement of egg by white lupine protein, emulsifiers and xanthan gum in yellow cakes. *European Food Research and Technology*. 213: 312-316.
- Aschemann-Witzel, J. y Peschel, A. O. 2019. Consumer perception of plant-based proteins: The value of source transparency for alternative protein ingredients. *Food Hydrocolloids*. 96: 20-28.
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T. y Varela, P. 2017. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*. 99: 58-71.
- Aslan, M. y Ertaş, N. 2020. Possibility of using “chickpea aquafaba” as egg replacer in traditional cake formulation. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 24: 1-8.
- Aslan, M. y Ertaş, N. 2021. Foam drying of aquafaba: Optimization with mixture design. *Journal of Food Processing and Preservation*. 45: e15185.
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M. y Oliveira, M. B. P. P. 2019. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*. 93: 53-68.
- Bovšková, H. y Míková, K. 2011. Factors influencing egg white foam quality. *Czech Journal of Food Sciences*. 29: 322-327.
- Boye, J., Zare, F. y Pletch, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*. 43: 414-431.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Buhl, T. F., Christensen, C. H. y Hammershøj, M. 2019. Aquafaba as an egg white substitute in food foams and emulsions: Protein composition and functional behavior. *Food Hydrocolloids*. 96: 354-364.
- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S. y Li, J. 2015. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*. 16: 234-242.
- Caubet, J. C. y Wang, J. 2011. Current understanding of egg allergy. *Pediatric Clinics*. 58: 427-443.
- Damian, J. J., Huo, S. y Serventi, L. 2018. Phytochemical content and emulsifying ability of pulses cooking water. *European Food Research and Technology*. 244: 1647-1655.
- Erem, E., Icyer, N. C., Tatlisu, N. B., Kilicli, M., Kaderoglu, G. H. y Toker, Ö. S. 2021. A new trend among plant-based food ingredients in food processing technology: Aquafaba. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-18.
- Fernando, S. y Manthey, F. A. 2022. Soluble phenolic compounds affect functional and rheological properties of black bean protein isolates. *Cereal Chemistry*. 99:119-129.
- Guha, M. y Zakiuddin Ali, S. 2002. Molecular degradation of starch during extrusion cooking of rice. *International Journal of Food Properties*. 5: 509-521.
- Gumus, C. E., Decker, E. A. y McClements, D. J. 2017. Formation and Stability of ω -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. *Food Biophysics*. 12: 186-197.
- He, Y., Meda, V., Reaney, M. J. y Mustafa, R. 2021a. Aquafaba, a new plant-based rheological additive for food applications. *Trends in Food Science & Technology*. 111: 27-42.
- He, Y., Purdy, S. K., Tse, T. J., Tar'an, B., Meda, V., Reaney, M. J. y Mustafa, R. 2021b. Standardization of aquafaba production and application in vegan mayonnaise analogs. *Foods*. 10: 1978.
- He, Y., Shim, Y. Y., Mustafa, R., Meda, V. y Reaney, M. J. T. 2019. Chickpea cultivar selection to produce aquafaba with superior emulsion properties. *Foods*. 8: 685.
- He, Y., Shim, Y. Y., Shen, J., Kim, J. H., Cho, J. Y., Hong, W. S., Meda, V. y Reaney, M. J. 2021c. Aquafaba from Korean soybean II: Physicochemical properties and composition characterized by NMR analysis. *Foods*. 10: 2589.
- Herald, T. J., Aramouni, F. M. y Abu-Ghoush, M. H. 2008. Comparison study of egg yolks and egg alternatives in French vanilla ice cream. *Journal of Texture Studies*. 39: 284-295.
- Huang, S., Liu, Y., Zhang, W., Dale, K. J., Liu, S., Zhu, J. y Serventi, L. 2018. Composition of legume soaking water and emulsifying properties in gluten-free bread. *Food Science and Technology International*. 24: 232-241.
- Janssen, M., Busch, C., Rödiger, M. y Hamm, U. 2016. Motives of consumers following a vegan diet and their attitudes towards animal agriculture. *Appetite*. 105: 643-651.
- Kim, J., Kim, J., Jeong, S., Kim, M., Park, S., Kim, I., Nam, I., Park, J. y Moon, K.-D. 2022. The quality characteristics of plant-based garlic mayonnaise using chickpea aquafaba with different ultrasonic treatment time. *Korean Journal of Food Preservation*. 29: 381-394.
- Lafarga, T., Villaró, S., Bobo, G. y Aguiló-Aguayo, I. 2019a. Optimisation of the pH and boiling conditions needed to obtain improved foaming and emulsifying properties of chickpea aquafaba using a response surface methodology. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 18: 100177.
- Lafarga, T., Villaró, S., Bobo, G., Simó, J. y Aguiló-Aguayo, I. 2019b. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in cooked pulses. *International Journal of Food Science & Technology*. 54: 1816-1823.

- Lin, M., Tay, S. H., Yang, H., Yang, B. y Li, H. 2017. Replacement of eggs with soybean protein isolates and polysaccharides to prepare yellow cakes suitable for vegetarians. *Food Chemistry*. 229: 663-673.
- Lu, C., Li, C., Chen, B. y Shen, Y. 2018. Composition and antioxidant, antibacterial, and anti-HepG2 cell activities of polyphenols from seed coat of *Amygdalus pedunculata* Pall. *Food Chemistry*. 265: 111-119.
- Ma, Z., Boye, J. I. y Simpson, B. K. 2016. Preparation of salad dressing emulsions using lentil, chickpea and pea protein isolates: A response surface methodology study. *Journal of Food Quality*. 39: 274-291.
- McClements, D. J., Bai, L. y Chung, C. 2017. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*. 8: 205-236.
- Meurer, M. C., de Souza, D. y Marczak, L. D. F. 2020. Effects of ultrasound on technological properties of chickpea cooking water (aquafaba). *Journal of Food Engineering*. 265: 109688.
- Muhalidin, B., Mohammed, N., Cheok, H., Farouk, A. y Meor Hussin, A. 2021. Reducing microbial contamination risk and improving physical properties of plant-based mayonnaise produced using chickpea aquafaba. *International Food Research Journal*. 28: 547-553.
- Mustafa, R., He, Y., Shim, Y. Y. y Reaney, M. J. T. 2018. Aquafaba, wastewater from chickpea canning, functions as an egg replacer in sponge cake. *International Journal of Food Science & Technology*. 53: 2247-2255.
- Mustafa, R. y Reaney, M. J. T. 2020. Aquafaba, from Food Waste to a Value-Added Product. En: *Food Wastes and By-products*. R. Campos-Vega, B. D. Oomah y H. A. Vergara-Castañeda (ed.), pp 93-126. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Nguyen, T. M. N. y Tran, G. B. 2021. Application of Chickpeas Aquafaba with pre-treatment as egg replacer in cake production. *Chemical Engineering Transactions*. 89: 7-12.
- Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I. y Kiosseoglou, V. 2010. Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 304-313.
- Park, H. Y., Yoon, T. J., Kim, H. H., Han, Y. S. y Choi, H. D. 2017. Changes in the antigenicity and allergenicity of ovalbumin in chicken egg white by N-acetylglucosaminidase. *Food Chemistry*. 217: 342-345.
- Patino, J. M. R., Sanchez, C. C. y Niño, M. R. R. 2008. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*. 140: 95-113.
- Raikos, V., Hayes, H. y Ni, H. 2020. Aquafaba from commercially canned chickpeas as potential egg replacer for the development of vegan mayonnaise: Recipe optimisation and storage stability. *International Journal of Food Science & Technology*. 55: 1935-1942.
- Serventi, L., Wang, S., Zhu, J., Liu, S. y Fei, F. 2018. Cooking water of yellow soybeans as emulsifier in gluten-free crackers. *European Food Research and Technology*. 244: 2141-2148.
- Sharif, H. R., Williams, P. A., Sharif, M. K., Abbas, S., Majeed, H., Masamba, K. G., Safdar, W. y Zhong, F. 2018. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants—A review. *Food Hydrocolloids*. 76: 2-16.
- Sharima-Abdullah, N., Hassan, C. Z., Arifin, N. y Huda-Faujan, N. 2018. Physicochemical properties and consumer preference of imitation chicken nuggets produced from chickpea flour and textured vegetable protein. *International Food Research Journal*. 25:1016-1025.
- Shim, Y. Y., Mustafa, R., Shen, J., Ratanapariyanuch, K. y Reaney, M. J. T. 2018. Composition and properties of aquafaba: water recovered from commercially canned chickpeas. *Journal of Visualized Experiments*. 132: e56305.
- Silva, P. G., Kalschne, D. L., Salvati, D., Bona, E. y Rodrigues, A. C. 2022. Aquafaba powder, lentil protein and citric acid as egg replacer in gluten-free cake: A model approach. *Applied Food Research*. 2: 100188.
- Stantiall, S. E., Dale, K. J., Calizo, F. S. y Serventi, L. 2018. Application of pulses cooking water as functional ingredients: the foaming and gelling abilities. *European Food Research and Technology*. 244: 97-104.
- Street, H. V. 1994. Measurement of the starch-iodine complex. En: *Methods of enzymatic analysis*. H. U. Bergmeyer (ed.), pp 898-903. Elsevier. Inc., Amsterdam.
- Włodarczyk, K., Zienkiewicz, A. y Szydłowska-Czerniak, A. 2022. Radical scavenging activity and physicochemical properties of aquafaba-based mayonnaises and their functional ingredients. *Foods*. 11:1129.

Efecto de la adición de almidón resistente tipo 3 de avena en las propiedades viscoelásticas de la masa y su influencia sobre la calidad de galletas

Effect of the addition of oat resistant starch type 3 on the viscoelastic properties of the dough and its influence on the quality of cookies

José Gabriel Monter-Miranda¹, Paul Baruk Zamudio-Flores^{1*}, Miguel Espino-Díaz¹, Juan Manuel Tirado-Gallegos², J Rodolfo Rendón-Villalobos³, Francisco Hernández-Centeno⁴, María Hernández-González⁴, Haydee Yajaira Lopez-De la Peña⁴, Gilber Vela-Gutiérrez⁵, René Salgado-Delgado⁶, Adalberto Ortega-Ortega⁷

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.-Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial, C.P. 31570 Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

² Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Periférico Francisco R. Almada km. 1, C.P. 31453, Chihuahua, Chihuahua, México.

³ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Calle Ceprobi No. 8, Colonia San Isidro, C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México.

⁴ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. División de Ciencia Animal. Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

⁵ Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales, Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente 1150. Col. Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29000.

⁶ Instituto Tecnológico Nacional/Instituto Tecnológico de Zacatepec, Posgrado-Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Calzada Tecnológico 27, Zacatepec, Morelos, México, C.P. 62780.

⁷ Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Extensión Cuauhtémoc, Barrio de la presa s/n, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, C.P. 31510.

RESUMEN

El almidón resistente (AR) es una fracción del almidón no digerible por las α -amilasas y a diferencia de la fibra dietética, el AR es fermentado en el colon promoviendo beneficios en la salud. Dentro de los diferentes tipos de AR, el tipo 3 (AR3) se obtiene por autoclaveado y sin el uso de agentes químicos. El objetivo de este estudio fue obtener AR3 a partir de avena y evaluar su efecto a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 %, p/p) sobre las propiedades reológicas de la masa, propiedades de textura de las galletas y su aceptabilidad sensorial. El análisis de perfil de textura (TPA) evidenció un incremento en la fracturabilidad, dureza, adhesividad y gomosidad. La incorporación de AR3 incrementó el módulo elástico (G') y viscoso (G'') en comparación con la masa control. Todos los tratamientos presentaron comportamiento elástico ($G' > G''$). La dureza en las galletas aumentó con la concentración de AR3, con valores de ≈ 8 N (control) hasta 20 N (AR3-20 %). Las pruebas sensoriales no fueron significativas entre tratamientos, aunque las galletas AR3-20 % tuvieron mayor preferencia. La adición de AR3 en la masa provocó cambios funcionales y de textura significativos que afectaron positivamente los atributos de calidad de las galletas.

Palabras clave: Almidón resistente; Autoclaveado; Avena; Galletas.

ABSTRACT

Resistant starch (RS) is a portion of starch that is not digestible by α -amylases and unlike dietary fiber, RS is fermented in the colon, promoting health benefits. Among the different types of RS, type 3 (RS3) is obtained by autoclaving and without chemical agents. The objective of this work was to obtain RS3 from oats and to evaluate its effect at different concentrations (0, 5, 10, 15 and 20 % w/w) on the rheological properties of the dough, textural properties of the cookies and their sensory acceptability. Texture profile analysis (TPA) showed an increased fracturability, hardness, adhesiveness and gumminess. The incorporation of RS3 increased the elastic (G') and viscous (G'') modulus compared to the control dough. All treatments showed elastic behavior ($G' > G''$). Hardness in cookies increased with RS3 concentration, with values from ≈ 8 N (control) to 20 N (RS3 - 20 %). Sensory tests were not significant between treatments, although RS3-20 % cookies had a higher preference. The addition of RS3 in the dough caused significant functional and textural changes that positively affected the quality attributes of the cookies.

Keywords: Resistant starch; Autoclaving; Oat; Cookies.

INTRODUCCIÓN

Las galletas se consideran uno de los alimentos de mayor gusto y popularidad a nivel mundial (Kaur *et al.*, 2019), ya que son productos con mayor vida de anaquel, listos para comer, de fácil disponibilidad y gran versatilidad (Lee *et al.*, 2016; Agrahar-Murugkar *et al.*, 2018). Debido a que las galletas contienen harina, grasa o mantequilla, huevo y azúcar, la interacción entre todos estos componentes durante el mezclado puede afectar las propiedades viscoelásticas (poseen propiedades viscosas como los fluidos y elásticas como los sólidos). Por lo anterior, un análisis reológico provee información que ayuda a entender mejor la estructura de estos componentes (Tecante, 2001; Singh *et al.*, 2003). En este sentido, las pruebas dinámicas son comúnmente utilizadas para evaluar los cambios en los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de la muestra con respecto a la deformación y a la frecuencia aplicada mediante un movimiento oscilatorio de baja amplitud del esfuerzo (Núñez-Santiago *et al.*, 2001; Villanueva *et al.*, 2018).

Actualmente, existe un mayor interés por la adición de ingredientes funcionales como la fibra dietaria y la inclusión de almidón resistente (AR) en productos horneados (Giuberti *et al.*, 2017; Kahraman *et al.*, 2019). La ingesta de estos alimentos funcionales puede beneficiar la salud humana y en el tratamiento de diversas patologías crónico-degenerativas (diabetes mellitus, problemas cardiovasculares y algunos tipos de cáncer) (Nugent, 2005; Ashwar *et al.*, 2016). El AR se refiere a la porción de almidón y productos de almidón que resisten el ataque de las enzimas digestivas y siguen su tránsito a través del tracto gastrointestinal (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010). Sus beneficios en la salud humana van desde la prevención de cáncer de colon, control de la respuesta glucémica, mejoramiento de la salud intestinal, incremento de la saciedad hasta mejoramiento del perfil de lípidos en sangre (Nugent, 2005; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010). Englyst *et al.* (1992) clasificaron al AR en 4 categorías, dependiendo de la resistencia a la digestión enzimática, en este sentido el almidón resistente tipo 3 (AR3) se refiere a las moléculas de almidón retrogradadas que no son capaces de unirse al sitio activo de las enzimas α -amilasas (Wong y Louie, 2016). Una de las principales ventajas del AR3 es que no se requieren reactivos químicos para su obtención, ya que se puede obtener por autoclaveado. Existe gran interés por la incorporación de AR3 en diversos alimentos, incluyendo las galletas. Al respecto, Aparicio-Saguilán *et al.* (2007) elaboraron una galleta adicionada con AR (obtenido de un tratamiento de hidrólisis ácida y autoclaveado a partir de almidón nativo de plátano) y comprobaron su idoneidad en cuanto a sus propiedades funcionales y a la reducción significativa del índice glicémico (IG). Recientemente, Giuberti *et al.* (2017) reportaron que la incorporación de AR a galletas elaboradas con harina de arroz, es viable y que algunos AR presentan adecuadas propiedades para incrementar el contenido de fibra total. El almidón se obtiene principalmente de fuentes convencionales como el maíz y la papa; sin embargo, existe un gran interés por almidones obtenidos a partir de fuentes

sub-utilizadas o no convencionales que puedan ofrecer propiedades funcionales similares o superiores a las encontradas en almidones de fuentes convencionales (Zhang *et al.*, 2016). En este sentido, la avena es una fuente sub-utilizada de almidón (55 a 63.5 %) ampliamente cultivada en el Noroeste de México (Zamudio-Flores *et al.*, 2015). Por tal razón, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AR3 (obtenido de almidón nativo de avena) en las propiedades viscoelásticas y de textura de una masa para galletas y en determinar su influencia en la dureza y las propiedades sensoriales de las galletas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron cuatro lotes de 10 kg de avena (*Avena sativa* cv Cuauhtémoc) descascarillados, en estado seco (maduro) los cuales se adquirieron de la compañía Avenas del Norte S.A. de C.V. ubicada en Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Todos los reactivos químicos utilizados para el análisis químico proximal y en la modificación del almidón fueron de grado alimenticio adquiridos en Sigma-Aldrich, Co. (Toluca, Estado de México, México). Para la elaboración de las galletas se utilizaron harina de trigo "El globo", mantequilla LALA sin sal, margarina Elgine, azúcar glass Dulza mía y huevos Bachoco los cuales se adquirieron en una tienda de supermercado (Al Súper, S.A. de C.V.) en Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

Métodos

Obtención de la harina de avena y aislamiento de su almidón

Para la obtención de la harina de avena se utilizó la metodología reportada por Zamudio-Flores *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Para lo cual los granos de avena se sometieron a una molienda húmeda en una licuadora de 500 W (Oster Designer, modelo M4127-13, Sunbeam Products Inc., Boca Raton, FL, EUA) a máxima velocidad durante 3 min. Posteriormente, el producto de la molienda se filtró manualmente en un tamiz con tamaño de poro de $\approx 100 \mu\text{m}$, el filtrado obtenido se dejó reposar durante 24 h en contenedores de vidrio. Se realizó un primer lavado, se agitó vigorosamente hasta lograr una muestra homogénea, que se dejó reposar durante 24 h para nuevamente lavar el precipitado. Este paso se repitió 2 veces más. Después del último lavado, se procedió a vaciar el contenido de los contenedores de vidrio en charolas de aluminio, dejando capas delgadas, para después someterlas a un secado continuo durante 48 ± 4 h a una temperatura de 35°C . Una vez que estuvo seca la pasta, se molió en un mortero y se tamizó manualmente una malla mediana (1 mm) para homogeneizar el tamaño de partícula, obteniendo así la harina de avena.

El almidón nativo (AN) se aisló a partir de la harina de avena utilizando la metodología anteriormente citada por Zamudio-Flores *et al.* (2015). Para esto se formó una dispersión de harina al 35 % con agua destilada y bajo agitación

constante en un agitador (IKA, modelo RW 20 DSI, Staufen, Alemania) a 200 rpm y se ajustó el pH a 9 con NaOH 1 M. La harina se dejó reposar durante 24 h y se realizaron 3 lavados consecutivos en intervalos de 24 h y posteriormente se filtró manualmente a través de una malla de 70 μm . El producto de la filtración se ajustó a pH 7 con HCl 1 N y se dejó reposar por 24 h, repitiéndose este paso con 3 lavados sucesivos. El producto obtenido se secó a 35 °C por 72 h en una estufa de convección forzada (FinePCR, modelo combi-SV12DX, Daigger, Vernon Hills, IL, EUA), se molió en un mortero de porcelana y se tamizó manualmente en un tamiz de 0.150 mm para obtener uniformidad en las partículas.

Preparación del almidón resistente tipo 3 (AR3)

El AR3 se obtuvo a partir de la muestra de almidón extraída de la harina de avena, utilizando el método propuesto por Berry (1986). Se pesaron 60 g (en base seca) de almidón y se mezclaron con 210 mL de agua. La dispersión de almidón se sometió a calentamiento en autoclave a 121 - 127 °C durante 1 h; posteriormente se dejó enfriar y se almacenó a 4 °C por 24 h. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, la muestra se sometió a un proceso de liofilización en un liofilizador (Labconco, modelo Freezone 6, Kansas City, MO, EUA) y posteriormente, se molió en un molino (corte/impacto) universal de 550 Watts (IKA, modelo M 20, Staufen, Alemania) con una velocidad máxima de 20,000 rpm hasta que pasó a través de un tamiz de 0.150 mm.

Evaluación del color de la harina, almidón nativo, AR3 y galletas

El color de la harina, los almidones (nativo y AR3) y las galletas se determinó con un colorímetro Minolta (Modelo CR-300, Osaka, Japón), utilizando el sistema CIELab (L^* , a^* , b^*). Las mediciones del color se realizaron por quintuplicado para cada muestra.

Determinación de almidón total (AT)

La determinación de almidón total (AT) se realizó utilizando el kit de Megazyme, mediante el método oficial 76-13.01 de la AACC (2000). Para la determinación de AT se pesaron 100 mg de muestra en un tubo de centrifuga y se agregaron 0.2 mL de etanol al 80 %. La mezcla se agitó durante 18 h a 4 °C y luego se le adicionaron 8 mL de búfer de acetato de sodio 1.2 M (pH = 3.8). Después se agregaron 0.1 mL de α -amilasa termoestable y 0.1 mL de amiloglucosidasa. La mezcla se colocó en un baño de agua a 50 °C durante 30 min con agitación constante, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y finalmente se centrifugó a $1,800 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un matraz y se realizaron dos lavados con 10 mL de agua destilada. De la mezcla resultante se tomaron alícuotas de 0.1 mL que se colocaron en tubos de vidrio por triplicado. La determinación de glucosa se realizó leyendo la densidad óptica de las muestras a 510 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic Instrument, Inc. Rochester, NY, EUA).

Determinación de almidón disponible (AD)

La determinación de AD se realizó de acuerdo con el método reportado por Holm *et al.* (1989). Se pesaron 500 mg de muestra y se le agregaron 20 mL de agua destilada. La mezcla se agitó durante 10 min y posteriormente se agregaron 100 μL de Termamyl. La mezcla se colocó en baño a ebullición durante 20 min, con agitación cada 5 min, después de lo cual se dejó reposar hasta lograr una temperatura de 30 - 40 °C y se transfirió a un matraz aforado de 100 mL. En un tubo de vidrio se colocaron 1 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 4.75), 25 μL de amiloglucosidasa y 500 μL de muestra del matraz aforado de 100 mL, los cuales se incubaron por 30 min a 60 °C con agitación constante. El contenido del tubo se pasó a un matraz aforado de 10 mL y se tomaron 50 μL de la muestra para determinar la glucosa liberada por digestión enzimática, mediante el método GOD/PAD (glucosa/oxidasa peroxidasa), leyendo la densidad óptica de las muestras a 510 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic Instrument, Inc Rochester, NY, EUA).

Determinación de almidón resistente

Para la determinación de almidón resistente (AR), sin importar su tipo; en las muestras amiláceas se utilizó la metodología reportada por Goñi *et al.* (1996), la cual permite determinar el contenido de almidón indigerible. Se pesaron 100 mg de muestra en un tubo de centrifuga, se agregaron 10 mL de solución amortiguadora de KCl-HCl (pH 1.5) y posteriormente se agregaron 200 μL de solución de pepsina (la solución de pepsina se preparó en una relación de 25 mg de pepsina con 250 μL de buffer KCl-HCl por muestra). La muestra se mezcló y se puso en agua a 40 °C durante 60 min con agitación constante. Después se dejó reposar a temperatura ambiente y se adicionaron 9 mL de solución amortiguadora de trismaleato (pH 6.9) y posteriormente. Se adicionaron 40 mg de α -amilasa y se mezcló e incubó por 16 h en baño María a 37 °C con agitación constante, para después centrifugar la muestra durante 15 min a $3000 \times g$ a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con 10 mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 3 mL de agua destilada y 3 mL de KOH 4 M, preparado ese mismo día, y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante. Se adicionaron 5.5 mL de HCL 2 M y 3 mL de solución amortiguadora de acetato de Na 0.4 M (pH 4.75) y 25 μL de amiloglucosidasa, e inmediatamente se colocaron durante 45 min en baño de agua a 60 °C con agitación constante. La muestra se centrifugó por 15 min a $3000 \times g$ a 4 °C y el sobrenadante se recolectó y se aforó a 50 mL. El residuo se lavó dos veces más con 10 mL de agua destilada en cada ocasión y el sobrenadante se combinó con el obtenido previamente. Después se aforó a 50 mL y se tomaron 50 μL de muestra para determinar la glucosa liberada por digestión enzimática, mediante el método GOD/PAD (glucosa/oxidasa peroxidasa), leyendo las densidades ópticas de las muestras a 510 nm.

Preparación de las galletas

Para evaluar el efecto del AR3 en la elaboración de galletas, se utilizó masa para los siguientes tratamientos: Masa con 100 % de harina de trigo (control), y masas en las que se sustituyó el 5, 10, 15 y 20 % en peso de la harina de trigo por AR3, para los tratamientos con la nomenclatura de AR3-5 %, AR3-10 %, AR3 - 15 % y AR3 - 20%, respectivamente. Para la elaboración de las galletas se colocaron la mantequilla (16 %, p/p) y la margarina (16 %, p/p) en el tazón de una batidora de pedestal (Modelo Mixmaster 2700, Marca Oster, Tlanepilantla, Estado de México) y se batieron a la velocidad media durante 5 min (velocidad 4). Después de 5 min se redujo la velocidad (velocidad 1) durante otros 5 min, agregando azúcar glass (16 %, p/p) en pequeñas cantidades. Después de este tiempo se agregaron yemas de huevo (2 % p/p), posteriormente se agregó la harina de trigo (sin AR3, llamado control) o con la proporción correspondiente de AR3 para cada tratamiento, y se dejó 1 min más a velocidad lenta para que se mezclara la harina y las yemas, obteniéndose la masa para las galletas. La masa se envolvió en plástico y se aplanó con un rodillo hasta presentar un grosor uniforme de 1 cm. Para la elaboración de las galletas, las masas se cortaron con moldes de aluminio de diferentes figuras, y se colocaron en charolas de aluminio las cuales se metieron en el horno de una estufa industrial CORIAT (modelo EC-4HM, marca Servinox, Compañía Institucional de Muebles de Acero, S.A. de C.V., Ciudad de México, México) con temperatura constante de 160 °C durante 20 - 25 min. Se sacaron las charolas y las galletas se dejaron enfriar a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) por al menos 10 min.

Características viscoelásticas de la masa para galletas

Las pruebas reológicas oscilatorias dinámicas se utilizaron para determinar las propiedades viscoelásticas de la masa utilizada para la elaboración de las galletas. Estas se realizaron mediante un reómetro con control del esfuerzo AR1500ex (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) equipado con un baño de recirculación de agua y una geometría de placas paralelas de acero inoxidable (60 cm de diámetro) y utilizando un gap de 1500 μm . La temperatura se controló con el baño termo-circulador de agua y con la unidad de control de temperatura Peltier. Primeramente, para simular los cambios estructurales que experimenta la masa durante su calentamiento en el horneado, se evaluó el comportamiento de los módulos G'' y G' y su relación G''/G' ($\tan \delta$, también conocido como factor de pérdida) durante el calentamiento de 25 a 85 °C a una velocidad constante de 5 °C/min bajo una deformación constante de 0.5 % (Sinthusamran *et al.* 2019). La temperatura explorada estuvo limitada por las condiciones de operación del baño termostático y de la placa Peltier del reómetro, motivo por el cual no se trabajó a mayor temperatura (> 85 °C). Además, se evaluó la dependencia de las propiedades viscoelásticas (G'' , G' y $\tan \delta$) a 25 y 85 °C en función del tiempo, esfuerzo oscilatorio, barrido de deformación y frecuencia. El barrido del tiempo se realizó durante 15 min bajo una frecuencia constante de 1 Hz. Los barridos del esfuerzo oscilatorio se realizaron a de 0.1 a 10 Pa; mientras

que el barrido de la deformación fue de 0.1 a 10%, ambos experimentos fueron desarrollados a una frecuencia constante de 1 Hz. Posteriormente, se realizó la prueba del barrido de frecuencia de 0.01 a 10 Hz con un esfuerzo de deformación constante (0.5 %). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las desviaciones estándar entre las corridas no excedieron del 5 %.

Textura de la masa para galletas

Para evaluar el efecto de la adición de las diversas concentraciones de AR3 en la textura de la masa, se realizó un análisis de perfil de textura en la masa (TPA) para la determinación de las variables de fracturabilidad, dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad, elasticidad y masticabilidad empleando una sonda esférica de 1" de acero inoxidable (código de parte = P/15). Para esta evaluación se utilizaron muestras de masa en forma de cubos (con las medidas de $5 \times 5 \times 5$ cm) al menos por triplicado para cada formulación. Las muestras de masa se comprimieron a un 25 % de su altura inicial. Para evaluar el efecto de la adición de AR3 sobre la dureza de las galletas, también se empleó un análisis de TPA, pero para esto se utilizó una sonda cilíndrica de 1" de aluminio (código de parte = P/25) y únicamente se reportó esta variable (dureza) del TPA. En ambas determinaciones se utilizó un texturómetro TA.XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, U.K.) equipado con una celda de carga de 30 kg y ambas pruebas se realizaron a una velocidad de 25 mm/s.

Evaluación sensorial de las galletas

Para la evaluación sensorial se utilizó una prueba de preferencia tipo escalar de acuerdo a la metodología reportada por Utrilla-Coello *et al.* (2011). Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos, donde 9 = gusta muchísimo y 1 = disgusta muchísimo. Se realizó la evaluación sensorial a 51 personas (26 del sexo masculino y 25 del sexo femenino, todas comprendidas entre las edades de 18 a 50 años), a las que previamente se les explicó el protocolo de evaluación. Para la prueba de preferencia, las galletas se colocaron en platos desechables codificados en base a la nomenclatura de tres letras mayúsculas (ABC) en orden aleatorizado.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en un diseño completamente aleatorizado. El tamaño de muestra en todos los experimentos realizados fue mínimo de 3 ($n \geq 3$) o se indicó el tamaño en cada experimento. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA, $p \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico Sigma-Stat, versión 2.03 (Fox *et al.*, 1995). Para las diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de las medias (Walpole *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación fisicoquímica de la harina, almidón nativo y almidón resistente

Análisis químico proximal

Se observó que los contenidos de lípidos, proteínas, cenizas, fibra y humedad disminuyeron significativamente ($p < 0.05$)

en las muestras de almidón nativo (AN) y en la muestra sometida al autoclaveado (AR3) en comparación con la muestra de harina (HA) (Tabla 1). Esto se debió a los tratamientos físicos aplicados a dichas muestras; mientras que el contenido de carbohidratos totales fue mayor en las muestras de AN y AR3. El contenido de proteína fue menor en el AR3 (1.37 %, p/p) respecto al AN (1.64 %); sin que se observaran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos, lo cual probablemente se debió a que los tratamientos térmicos reducen el contenido de ciertos aminoácidos (Rehman y Shah, 2005), y como consecuencia, el contenido de proteínas.

Tabla 1. Composición química y determinación enzimática *in vitro* de las fracciones de almidón en las muestras de harina (HA), almidón nativo (AN) y almidón resistente tipo 3 de avena (AR3).*

Table 1. Chemical composition and *in vitro* enzymatic determination of starch fractions in samples of flour (HA), native starch (AN) and oatmeal resistant starch type 3 (AR3).*

Análisis (%)	Muestra		
	HA	AN	AR3
Lípidos	5.85 ± 0.50 ^a	1.26 ± 0.25 ^b	0.85 ± 0.05 ^c
Proteínas ¹	7.10 ± 0.09 ^a	1.64 ± 0.06 ^b	1.37 ± 0.02 ^b
Cenizas	0.51 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.01 ^b
Humedad	7.46 ± 0.06 ^a	6.20 ± 0.11 ^b	3.90 ± 0.01 ^c
Carbohidratos totales ²	86.54 ± 1.15 ^b	97.91 ± 0.28 ^a	97.53 ± 1.11 ^a
Fibra dietaria total	4.65 ± 0.10 ^a	1.16 ± 0.25 ^b	0.53 ± 0.01 ^c
Almidón total	70.15 ± 2.15 ^b	86.70 ± 1.18 ^a	5.28 ± 0.15 ^c
Almidón disponible	25.14 ± 1.11 ^b	98.10 ± 0.21 ^a	1.11 ± 0.17 ^c
Almidón resistente	2.25 ± 0.20 ^b	2.10 ± 0.35 ^b	8.30 ± 0.50 ^a

*Media aritmética de cinco repeticiones ± error estándar. Promedios con letras minúsculas iguales en la misma fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

¹Cuantificado por el método Kjendahl. Factor de conversión de $N_2 = 5.70$.

²Carbohidratos totales obtenidos por diferencia.

*Arithmetic mean of five repetitions ± standard error. Means with the same lowercase letters in the same row are not significantly different ($p > 0.05$).

¹Quantified by the Kjendahl method. N_2 conversion factor = 5.70.

²Total carbohydrates obtained by difference.

El contenido de AR incrementó desde un valor de 2.25 % (para la muestra HA) hasta 8.30 % en la muestra que se sometió a la modificación física de autoclaveado (AR3), lo cual indicó que por medio de la aplicación de esta modificación física a través del tratamiento hidrotérmico por autoclaveado

fue posible incrementar los niveles de almidón resistente. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros investigadores en cuanto a la factibilidad de utilizar el proceso físico de autoclaveado para lograr mayores contenidos de almidón resistente (González-Soto *et al.*, 2004; Aparicio-Saguilán *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). El porcentaje de almidón resistente sugiere que las muestras contienen almidón con una mayor proporción de amilopectina que de amilosa, ya que se ha reportado que cuando la amilosa supera el 70 %, se obtienen incrementos de almidón resistente superiores al 20 % (Sajilata *et al.*, 2006). Aunque la HA utilizada mostró un contenido de fibra dietética considerable (≈ 4.7 %), se ha reportado que ésta no tiene efecto sobre el rendimiento de almidón resistente (Sajilata *et al.*, 2006).

Evaluación de color

Los resultados de la evaluación de color en la HA y en los almidones (nativo y AR3) se observan en la Tabla 2. El factor de luminosidad (L) incrementó en la muestra de AN y en el AR3 en comparación con la HA, indicando que se obtuvo un material blanco y que el aislamiento fue efectivo (Rutenberg y Solarek, 1984); sin embargo, en la muestra de AR3 se observó una ligera disminución en esta variable en comparación con la muestra de AN. Lo anterior se debió a un factible oscurecimiento del tipo no enzimático producido por la reacción de Maillard, ya que el AR3 se obtuvo de la HA y como se puede observar en la Tabla 1, el contenido de proteínas en la HA fue considerablemente alto, por lo que se favoreció dicha reacción al realizar el proceso de autoclaveado (temperaturas elevadas) y debido a la presencia de grupos carbonilos (extremos reductores de almidón) y grupos aminos (presentes en las proteínas) (Rutenberg y Solarek, 1984; Shepherd *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2004; Akhtar y Dickinson, 2007; O'Regan y Mulvihill, 2010). Diversos investigadores han reportado que durante el aislamiento del almidón a partir de la harina se eliminan algunas impurezas como pueden ser carotenoides, xantofilas, celulosa, lignina y algunos otros pigmentos no determinados que tienden a oscurecer ligeramente la harina (Kuakpetoon y Wang, 2001; Adebowale *et al.*, 2002; Sánchez-Rivera *et al.*, 2005). En las coordenadas a*, b* y en el croma se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 2. Evaluación de color en harina (HA), almidón nativo (AN) y almidón resistente tipo 3 de avena (AR3).*

Table 2. Color evaluation in flour (HA), native starch (AN) and oat resistant starch type 3 (AR3).*

Muestra	Variable de color				
	L*	a*	b*	C	°h
HA	86.24 ± 0.04 ^c	0.99 ± 0.01 ^a	10.37 ± 0.03 ^a	10.4 ± 0.03 ^a	85.04 ± 0.17 ^b
AN	97.21 ± 0.04 ^a	0.012 ± 0.00 ^b	1.88 ± 0.03 ^c	1.88 ± 0.03 ^c	89.68 ± 0.36 ^a
AR3	94.90 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.00 ^c	5.98 ± 0.02 ^b	5.98 ± 0.04 ^b	89.02 ± 0.04 ^a

*Media aritmética de cinco repeticiones ± error estándar. Promedios con letras minúsculas iguales en la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

L = luminosidad, °h = ángulo hue, C = variable croma (intensidad), a = coordenada a (rojo/verde) y b = coordenada b (amarillo/azul).

*Arithmetic mean of five repetitions ± standard error. Means with the same lowercase letters in the same column are not significantly different ($p > 0.05$).

L = luminosity °h = hue angle, C = chroma variable (intensity), a = coordinate a (red/green) and b = coordinate b (yellow/blue).

entre las muestras, solamente el η permaneció sin cambio significativo entre las muestras de AN y AR3, pero sí incrementaron ligeramente con respecto a la muestra de HA. En base a estos resultados podemos decir que la muestra de HA presentó una ligera tonalidad café-amarilla; mientras que el AN fue completamente blanco y la muestra de AR3 presentó un color ligeramente amarillo. La evaluación física de color es una de las principales determinaciones de la calidad en productos amiláceos, ya que el consumidor prefiere productos con una tonalidad blanca (Zamudio-Flores *et al.*, 2007).

Efecto del contenido de almidón resistente en las propiedades viscoelásticas de la masa

Barrido oscilatorio de tiempo y temperatura

Con respecto al barrido oscilatorio de tiempo (Figura 1a) se observó que los módulos dinámicos (G' y G'') exhibieron un comportamiento similar al de geles débiles a base de mezclas de harina de arroz y almidones de diferentes fuentes botánicas (en una relación 2:1 de harina almidón al 5% p/p), debido a que las pendientes son ligeramente positivas y las magnitudes de G' son mucho mayores que las de G'' (Oh *et al.*, 2010). Las grasas desempeñan una función importante en la formación de la estructura tridimensional del gluten en los productos de panificación. La fuerza deseable en la red de gluten depende del tipo de producto; mientras algunos pro-

ductos requieren de la formación de una extensa red de gluten, algunos otros como las galletas de masa corta, necesitan de la formación de una red de gluten limitada. Los resultados obtenidos en nuestro estudio no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') entre las diferentes masas para galletas, debido principalmente a que en todas las formulaciones se utilizó el mismo contenido de mantequilla y margarina, por lo que la adición de AR3 mostró un efecto mínimo sobre la estructura tridimensional de la masa para galletas, lo cual es un parámetro positivo en la determinación de la calidad sensorial de las galletas.

Para evaluar el efecto del calentamiento en las propiedades viscoelásticas de la masa para las galletas, se observó la evolución del módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') desde 25 a 85 °C (temperatura máxima alcanzada por el sistema durante el calentamiento) aplicando un barrido de temperatura (Figura 1c). Los valores obtenidos en ambas temperaturas (25 y 85 °C) y en todas las muestras presentaron una ligera disminución en ambos módulos al incrementar la temperatura de los barridos y se mantuvieron en esa disminución hasta llegar a un valor de temperatura cercano a los 50 °C, posteriormente no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$) en la evolución de dichos módulos. Estos resultados son congruentes con los comportamientos

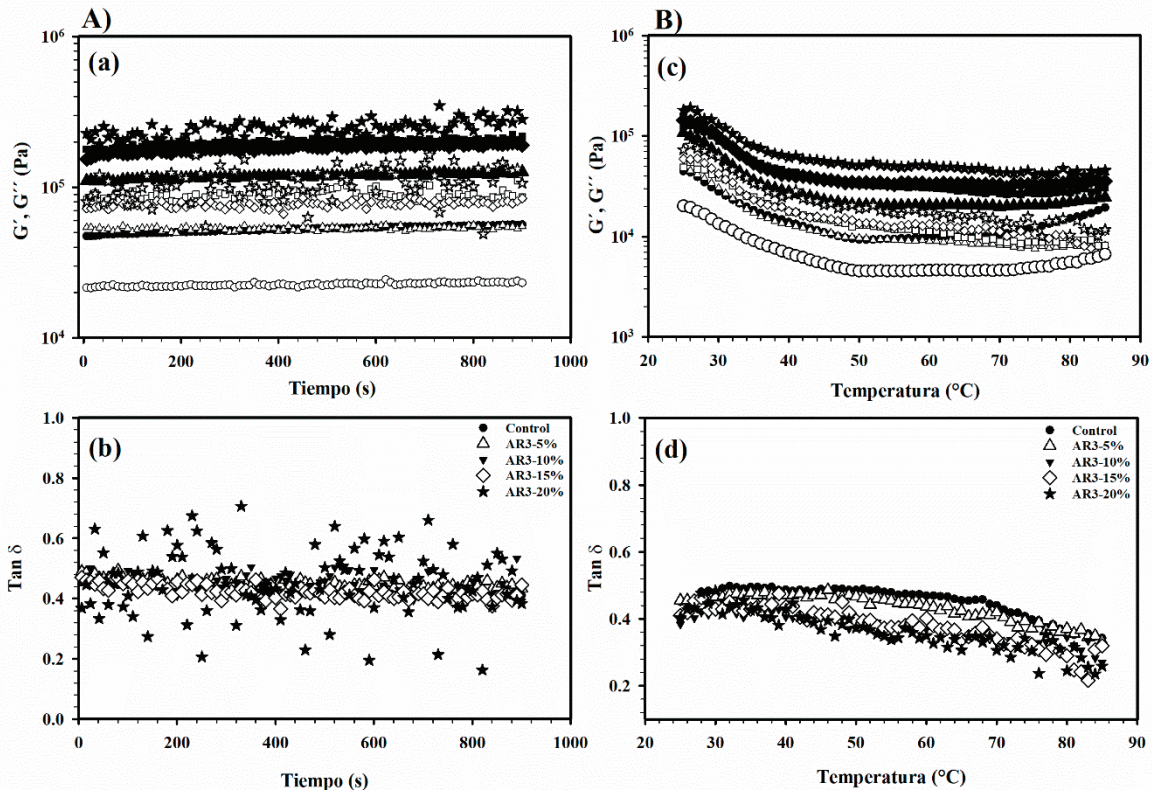


Figura 1. Dependencia del módulo de almacenamiento (G' , símbolos sólidos) y pérdida (G'' , símbolos abiertos) y tangente delta ($\tan \delta$) al A) tiempo (a,b) y B) temperatura (c, d) de masa control (●, ○) y con 5 % (AR3-5 %; ▲, △), 10 % (AR3-10 %; ■, □), 15 % (AR3-15 %; ◆, ◇) y 20 % (AR3-20 %; ★, ☆) de almidón resistente tipo 3 (AR3).

Figure 1. Storage (G' , solid symbols) and lost (G'' , open symbols) module dependence and delta tangent ($\tan \delta$) at A) time (a,b) and B) temperature (c, d) of dough control (●, ○) and with 5 % (AR3-5 %; ▲, △), 10 % (AR3-10 %; ■, □), 15 % (AR3-15 %; ◆, ◇) and 20 % (AR3-20 %; ★, ☆) of resistant starch type 3 (AR3).

reportados por Doğan (2002) quien observó que la tendencia inicial del valor de los módulos en masas calentadas a la temperatura de gelatinización decreció progresivamente arriba de una cierta temperatura (58 °C) lo cual indicó una disminución en las interacciones dentro del sistema. Sanz *et al.* (2005) estudiaron un intervalo de temperatura desde 10 a 60 °C y afirmaron que el batido (una fórmula de batido para freír) mostró una disminución en el módulo de la viscosidad compleja con un incremento inicial de la temperatura. Un incremento en las funciones viscoelásticas con la temperatura está asociado al proceso de gelatinización del almidón (Doğan, 2002; Salvador *et al.*, 2006; Baixauli *et al.*, 2007). El hecho de no haber observado estos incrementos en los módulos de las masas analizadas en nuestro estudio se debió a un retraso en el proceso fisicoquímico de la gelatinización, probablemente causado por una disminución del agua disponible dentro del sistema, como reportaron Baixauli *et al.* (2007). Por otra parte, en las Figuras 1c y 1d se presenta la dependencia del factor de pérdida (también conocido como tangente del ángulo de fase δ o $\tan \delta$) en función del barrido de tiempo y temperatura, respectivamente. Durante el barrido del tiempo (Figura 1c) se puede observar que para los tratamientos control, AR3-5 %, AR3-10 % y AR3-15 %, el valor de $\tan \delta$ se mantuvo prácticamente constante y sin variaciones significativas, por lo que la estabilidad de la masa durante el tiempo no es afectada por la presencia y concentración de AR3 en esos tratamientos (Piteira *et al.*, 2006). Solo se observaron variaciones en el tratamiento AR3-20 %, por lo que se puede intuir que la estabilidad de esta masa es dependiente del tiempo, dentro del intervalo evaluado. El factor de pérdida en función del barrido de temperatura (Figura 1d) presentó algunas variaciones, observándose que en todos los tratamientos la $\tan \delta$ presentó una caída a partir de los 33 °C, este fenómeno fue reportado recientemente por Varghese *et al.* (2020) y se atribuyó al punto de fusión de la mantequilla (~32 °C) en galletas a base de harina de jaca y mijo. Este descenso en la $\tan \delta$ se mantuvo hasta los 85 °C; sin embargo los valores inferiores se observaron en los tratamientos con 10, 15 y 20 % de AR3 (AR3-10 %, AR3-15 % y AR3-20 %, respectivamente). Este comportamiento sugiere que, dentro del rango de temperatura evaluado, el comportamiento elástico de las masas incrementó cuando estas se adicionaron con concentraciones de AR3 superiores al 5 %, lo que resultó en materiales menos viscosos (Sinthusamran *et al.*, 2019). En general, durante el incremento de tiempo y temperatura, los valores del factor de pérdida estuvieron por debajo del valor 1, por lo que las masas mantuvieron su estructura en las cuales predominó mayormente el comportamiento elástico que viscoso (Varghese *et al.*, 2020).

Barrido oscilatorio de esfuerzo

Cuando se realizaron los barridos oscilatorios de esfuerzo a las dos temperaturas de estudio (25 y 85 °C) se observó en todos los barridos una prevalencia del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G''), el cual fue en todos los casos mayor a la temperatura de 25 °C (Figura 2a) que a la temperatura de 85 °C (Figura 3a). No se observa-

ron cambios significativos entre los barridos realizados a la muestra control y los de las masas de los tratamientos AR3-5%, AR3-10% y AR3-15%; sin embargo, cuando se realizó el barrido oscilatorio de esfuerzo se observó un incremento en la formulación AR3-20%. Este incremento, es consistente con el efecto proporcionado por la adición de AR3 ingresado en la formulación de la masa. Diversos autores han observado que la adición de AR en diferentes cantidades incrementa el valor de los módulos dinámicos debido a que las estructuras más densas o de mayor cristalinidad del AR disminuyen la absorción de agua (se observa esta disminución en la humedad de la muestra AR3, ver Tabla 1) durante el calentamiento, y entonces causan un incremento en el módulo de almacenamiento (G') (Baixauli *et al.*, 2007; Korus *et al.*, 2009; Hong y Yoo, 2012; Witczak *et al.*, 2012). Otros investigadores han hipotetizado que este incremento está relacionado con la desaparición de estructuras amorfas dentro del gránulo, producto del efecto del autoclaveado, algo que estaría de acuerdo con estos resultados debido a que el AR obtenido en este estudio fue producido por un tratamiento hidrotérmico de alta presión (autoclaveado) (Unlu y Faller, 1998; Aparicio-Saguilán *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). El factor de pérdida en función del esfuerzo oscilatorio a 25 y 85 °C se muestra en las Figuras 2d y 3d, respectivamente. En las dos temperaturas evaluadas se puede apreciar que $\tan \delta < 1$, esto está en concordancia con lo observado en las Figuras 2a y 3a, donde $G' > G''$, confirmando el comportamiento viscoelástico de todas las muestras; sin embargo, la temperatura afectó el comportamiento del factor de pérdida, ya que los valores de $\tan \delta$ a 25 °C oscilaron entre 0.4 y 0.5, y cuando la temperatura aumentó a 85 °C, se observó que la $\tan \delta$ osciló entre 2.4 y 0.4. Este comportamiento sugiere un incremento en la contribución elástica del sistema (Laguna *et al.*, 2012).

Barrido oscilatorio de deformación

En todas las muestras analizadas se observó que el módulo de almacenamiento (G') a la temperatura de 25 °C (Figura 2b) fue mayor en comparación con el módulo G' a la temperatura de 85 °C (Figura 3b); sin embargo, en la masa para galleta control se observó una coincidencia en los módulos G' (85 °C) y G'' (25 °C) en el intervalo del porcentaje de deformación de 0.01 al 1 %, y posteriormente (> 1 %) se observó una ligera separación de dichos módulos. No se observó dicho comportamiento en las muestras de las masas AR3-5 %, AR3-10 % y AR3-20 %; sin embargo, en la muestra adicionada con AR3-15 % se observó un comportamiento similar a la muestra control, solamente que en este caso los módulos dinámicos coincidentes fueron los módulos de pérdida (módulos viscosos, G'') a las dos temperaturas de estudio. Dicho comportamiento tiene su explicación, en el sentido de que la cantidad de AR3 en esta muestra no tuvo ningún efecto en cuanto al módulo viscoso o de pérdida (G'') independientemente de la temperatura analizada. Algunos estudios han demostrado el efecto de fenómenos de gelación en mezclas de AR y harina de trigo conteniendo cantidades importantes de amilopectina en su almidón, con lo cual se observó un efecto del

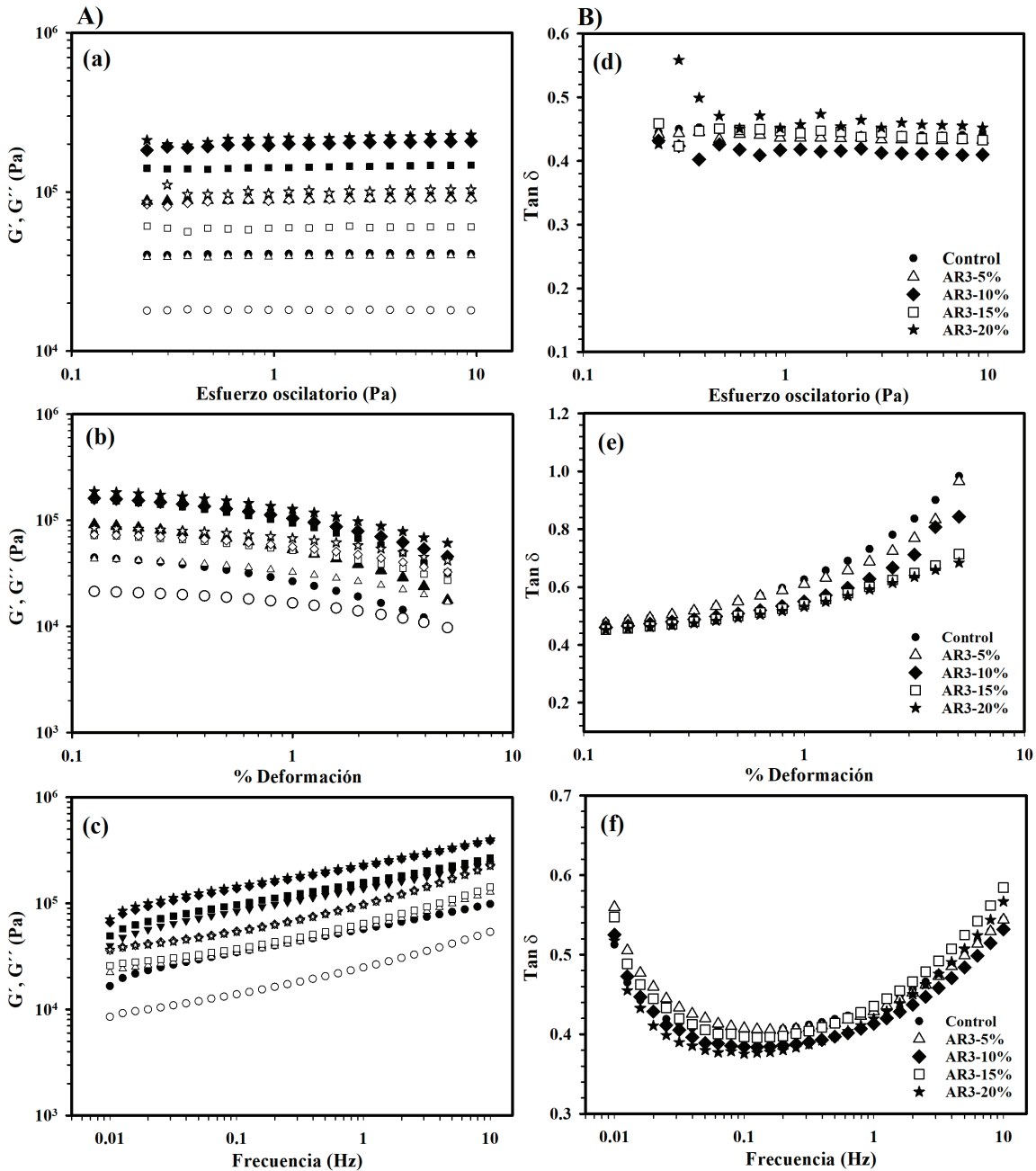


Figura 2. A) Dependencia del módulo de almacenamiento (G' , símbolos sólidos) y módulo de pérdida (G'' , símbolos abiertos) y B) tangente delta ($\tan \delta$) del barrido de esfuerzo oscilatorio (a, d), amplitud de la deformación (b, e) y barrido de frecuencia (c, f) de la masa control (●, ○) y con 5 % (AR3-5%; ▲, △), 10 % (AR3-10%; ■, □), 15 % (AR3-15%; ◆, ◇) y 20 % (AR3-20%; ★, ☆) de almidón resistente tipo 3 (AR3) a 25 °C.

Figure 2. A) Storage (G' , solid symbols) and lost (G'' , open symbols) module dependence and B) delta tangent ($\tan \delta$) from the oscillatory stress sweep (a, d), deformation % (b, e) and frequency sweep (c, f) from control dough (●, ○) and with 5 % (AR3-5%; ▲, △), 10 % (AR3-10%; ■, □), 15 % (AR3-15%; ◆, ◇) and 20 % (AR3-20%; ★, ☆) of resistant starch type 3 (AR3) at 25 °C.

tiempo sobre las características de las propiedades elásticas de la mezcla sin que se afectaran de manera significativa las características viscosas (Hong y Yoo, 2012). Por otra parte, en las Figuras 2d y 3d se muestra el comportamiento de la $\tan \delta$ a 25 y 85 °C. En ambos casos se observó que la $\tan \delta$ presento valores inferiores a 1, reafirmando el comportamiento visco-elástico ($G' > G''$) de las masas sin importar la temperatura.

Barrido oscilatorio de frecuencia

Cuando se realizaron los barridos oscilatorios de frecuencia a la temperatura de 25 °C (Figuras 2c) y de 85 °C (Figura 3c) se observó una ligera dependencia de los módulos dinámicos con respecto a los barridos de frecuencia indicando que el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') estuvieron en función de la frecuencia angular más que de las temperaturas de la prueba, lo cual fue mayormente per-

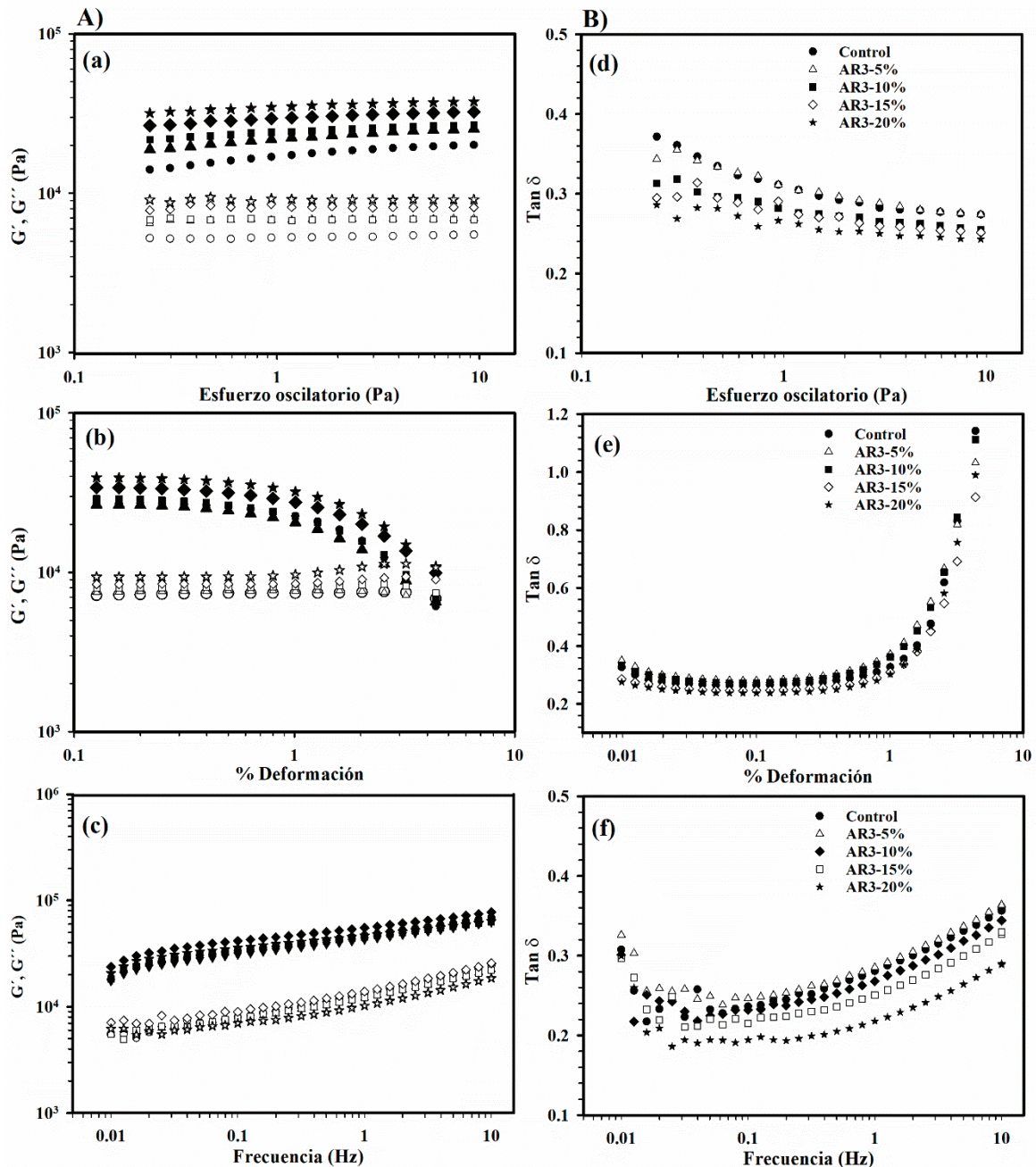


Figura 3. A) Dependencia del módulo de almacenamiento (G' , símbolos sólidos) y pérdida (G'' , símbolos abiertos) y B) tangente delta ($\tan \delta$) del barrido de esfuerzo oscilatorio (a, d), % deformación (b, e) y barrido de frecuencia (c, f) de masa control (●, ○) y con 5 % (AR3-5%; ▲, △), 10 % (AR3-10%; ■, □), 15 % (AR3-15%; ◆, ◇) y 20 % (AR3-20%; ★, ☆) de almidón resistente tipo 3 (AR3) a 85 °C.

Figure 3. A) Storage (G' , solid symbols) and lost (G'' , open symbols) module dependence and B) delta tangent ($\tan \delta$) from the oscillatory stress sweep (a, d), deformation % (b, e) and frequency sweep (c, f) from control dough (●, ○) and with 5 % (AR3-5%; ▲, △), 10 % (AR3-10%; ■, □), 15 % (AR3-15%; ◆, ◇) and 20 % (AR3-20%; ★, ☆) of resistant starch type 3 (AR3) at 85 °C.

ceptible en la muestra de masa para galleta control. Cuando se adicionó AR3 a 5% (AR3-5%), se observó una separación en los módulos de almacenamiento en las dos temperaturas del análisis y esta separación se incrementó a medida que aumentó la cantidad de AR3 adicionado en las muestras de masas. La variable $\tan \delta$ (relación de los módulos G''/G'), permaneció constante dentro de intervalo de valores de 0.1 a 1 y en ambas temperaturas tendió a separarse a medida que incrementó la frecuencia de la prueba (Figura 2f y 3f); tal

comportamiento está de acuerdo con lo reportado por Oh *et al.* (2010) en mezclas almidón y harina de arroz. En base a estos resultados, podemos deducir que la adición de AR3 promovió la retrogradación de amilosa y que esto estableció nuevas estructuras las cuales formaron entramados complejos con los otros ingredientes presentes en la formulación de la galleta sin que se afectara en predominio del módulo G' sobre G'' (Laguna *et al.*, 2013).

Efecto del AR3 en las propiedades de textura de la masa

El resultado del análisis de perfil de textura (TPA) realizado a las masas con las cuales se elaboraron las galletas se observa en la Tabla 3. Se evaluaron las variables de fracturabilidad, dureza, adhesividad, cohesividad, gomosidad, elasticidad y masticabilidad. En las variables de fracturabilidad, dureza, adhesividad y gomosidad se observaron incrementos significativos ($p < 0.05$) cuando se aumentó la cantidad de AR3 adicionado en la formulación de la masa; mientras que en la cohesividad y elasticidad prácticamente no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$). En la masticabilidad no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones control y AR3-5 % (masa con 5 % de almidón resistente) ni entre las formulaciones AR3-10 % y AR3-15 %, solamente se observó una diferencia significativa en la masa con la mayor cantidad de almidón resistente (muestra AR3-20 %). Estos resultados son congruentes con las pruebas reológicas dinámicas-oscilatorias en las cuales observamos un mayor predominio del módulo de elasticidad (G') sobre el módulo viscoso (G'') incrementándose en diversos ordenes de magnitud a medida que se incrementó el contenido de AR3 utilizado en las formulaciones. Esto explicaría el mayor incremento de las variables de fracturabilidad y dureza, ya que diversos estudios han correlacionado estas variables con un mayor predominio de G' en estudios de viscoelasticidad (Angioloni *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2003).

Efecto del AR3 en las propiedades de color, sensoriales y en la dureza de las galletas

Evaluación de color y dureza en las galletas

En la Tabla 4 se observan los resultados de la evaluación de color en las galletas control y en las galletas formuladas con las distintas concentraciones de AR3. Como se puede observar, el factor de luminosidad (L^*) indicó una ligera tendencia hacia menores valores cuando se incrementó la concentración de AR3 en la formulación de la galleta, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con la galleta control; sin embargo, no se observaron diferencias entre las formulaciones AR3-5 % y AR3-20 %, ni entre AR3-10 % y AR3-15 %. La disminución del factor L^* se debió a posibles

reacciones de obscurecimiento no enzimático (reacción de Maillard), ya que las galletas se sometieron a horneado y esta reacción es necesaria para dar una apariencia ligeramente café-amarilla (caramelización), lo cual se considera un atributo de calidad en las galletas y es una coloración deseable para el consumidor (Olinger y Pepper, 2001). Los resultados del factor L^* son ligeramente superiores a los reportados por Galdeano y Grossmann (2006) en galletas de harina de trigo y 20% de cascarilla de avena con un tratamiento físico (extrusión) y químico (oxidación con peróxido de hidrógeno alcalino) en donde obtuvieron valores $L^* = 63.10$ (cascarilla de avena tratada) y 62.90 (cascarilla de avena sin tratar). Es importante, además, considerar que los valores de las coordenadas a^* , b^* , croma (C) y ángulo hue ($^{\circ}h$) son descriptivos de un color en específico, indicando que las variaciones de color oscilaron entre la tonalidad ligeramente amarilla (control) a amarilla-café en las galletas adicionadas con AR3, encontrándose algunas diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas formulaciones.

En relación a la variable de dureza en las galletas, en términos generales observamos un incremento significativo ($p < 0.05$) en todas las formulaciones adicionadas con AR3 en comparación con la muestra control (sin AR3), y este fue mayor a medida que aumentó la cantidad de AR3 en la formulación de las galletas, llegando a ser de ≈ 156 % en las galletas con la mayor adición de AR3 (muestra AR3-20%).

Evaluación sensorial

En la Figura 4 se observan los resultados de evaluación sensorial de las galletas utilizando una escala hedónica. En general, las galletas adicionadas con AR3 en su formulación (AR3-5 %, AR3-10 % y AR3-15 %) mostraron una ligera disminución en la preferencia del consumidor; sin embargo, la galleta con 20 % de AR3 (AR3-20 %), no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a la muestra control, e incluso, los valores numéricos cuantitativos absolutos la posicionaron en aceptación por arriba de la galleta control (datos no mostrados). La presencia de AR3 en cantidades menores del 20% (AR3-5 %, AR3-10 % y AR3-15 %) afectó los atributos de calidad al indicar una sensación de arenosidad (datos no

Tabla 3. Resultado del análisis de perfil de textura (TPA) en masas con las diferentes formulaciones de galletas.*

Table 3. Texture profile analysis (TPA) results in doughs with different cookies formulations.*

Variable TPA	Formulaciones de galletas (en la masa)				
	Control	AR3-5 %	AR3-10 %	AR3-15 %	AR3-20 %
Fracturabilidad (N)	4.59 ± 0.13 ^d	6.71 ± 0.15 ^c	10.01 ± 0.11 ^b	11.25 ± 0.15 ^b	15.76 ± 0.39 ^a
Dureza (N)	5.07 ± 0.08 ^d	7.31 ± 0.05 ^c	10.82 ± 0.06 ^b	12.10 ± 0.07 ^b	16.98 ± 0.42 ^a
Adhesividad	13.89 ± 0.46 ^c	20.70 ± 1.54 ^c	36.66 ± 0.20 ^b	49.28 ± 2.90 ^a	57.07 ± 4.79 ^a
Cohesividad	0.40 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.01 ^a	0.42 ± 0.00 ^a	0.45 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.02 ^a
Gomosidad	2.03 ± 0.10 ^c	3.14 ± 0.10 ^c	4.54 ± 0.06 ^{b,c}	5.42 ± 0.18 ^{a,b}	7.20 ± 0.36 ^a
Elasticidad	1.26 ± 0.01 ^a	1.32 ± 0.03 ^a	1.20 ± 0.01 ^a	1.22 ± 0.01 ^a	1.23 ± 0.00 ^a
Masticabilidad	2.57 ± 0.13 ^c	2.57 ± 0.13 ^c	5.46 ± 0.10 ^b	6.56 ± 0.18 ^b	8.79 ± 0.40 ^a

*Media aritmética de cinco repeticiones ± error estándar. Promedios con letras minúsculas iguales en la misma fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

*Arithmetic mean of five repetitions ± standard error. Means with the same lowercase letters in the same row are not significantly different ($p > 0.05$).

Tabla 4. Evaluación física de color y dureza en las galletas control y con almidón resistente (AR) a las diferentes concentraciones.*

Table 4. Physical evaluation of color and hardness in control cookies and with resistant starch (AR) at different concentrations.*

Galleta	Variable de color					Dureza (N)
	L*	a*	b*	C	°h	
Control	78.48 ± 0.10 ^a	-1.13 ± 0.07 ^d	29.39 ± 0.11 ^b	29.94 ± 0.13 ^b	91.62 ± 0.12 ^a	7.85 ± 1.20 ^e
AR3-5%	73.58 ± 0.11 ^c	3.05 ± 0.09 ^a	31.09 ± 0.30 ^a	30.32 ± 0.13 ^a	84.52 ± 0.34 ^c	11.56 ± 1.73 ^d
AR3-10%	76.36 ± 0.13 ^b	0.82 ± 0.10 ^c	31.99 ± 0.19 ^a	31.50 ± 0.17 ^a	88.16 ± 0.20 ^b	14.17 ± 0.82 ^c
AR3-15%	76.61 ± 0.09 ^b	1.27 ± 0.14 ^b	30.50 ± 0.20 ^{a,b}	31.13 ± 0.39 ^a	87.76 ± 0.20 ^b	17.91 ± 1.01 ^b
AR3-20%	74.63 ± 0.28 ^c	3.25 ± 0.24 ^a	27.87 ± 0.09 ^c	28.06 ± 0.09 ^c	83.42 ± 0.04 ^c	20.11 ± 1.10 ^a

*Media aritmética de cinco repeticiones ± error estándar. Promedios con letras minúsculas iguales en la misma columna no son significativamente diferentes (p > 0.05). Control = Galleta sin la adición de almidón resistente. AR3-5 % = Galleta adicionada con 5 % de almidón resistente tipo 3 (AR3). AR3-10 % = Galleta adicionada con 10 % de almidón resistente tipo 3 (AR3). AR3-15 % = Galleta adicionada con 15 % de almidón resistente tipo 3 (AR3). AR3-20 % = Galleta adicionada con 20 % de almidón resistente tipo 3 (AR3).

*Arithmetic mean of five repetitions ± standard error. Means with the same lowercase letters in the same column are not significantly different (p > 0.05). Control = Cookie without the addition of resistant starch. AR3-5 % = Cookie added with 5 % resistant starch type 3 (AR3). AR3-10 % = Cookie added with 10 % resistant starch type 3 (AR3). AR3-15 % = Cookie added with 15 % resistant starch type 3 (AR3). AR3-20 % = Cookie added with 20 % resistant starch type 3 (AR3).

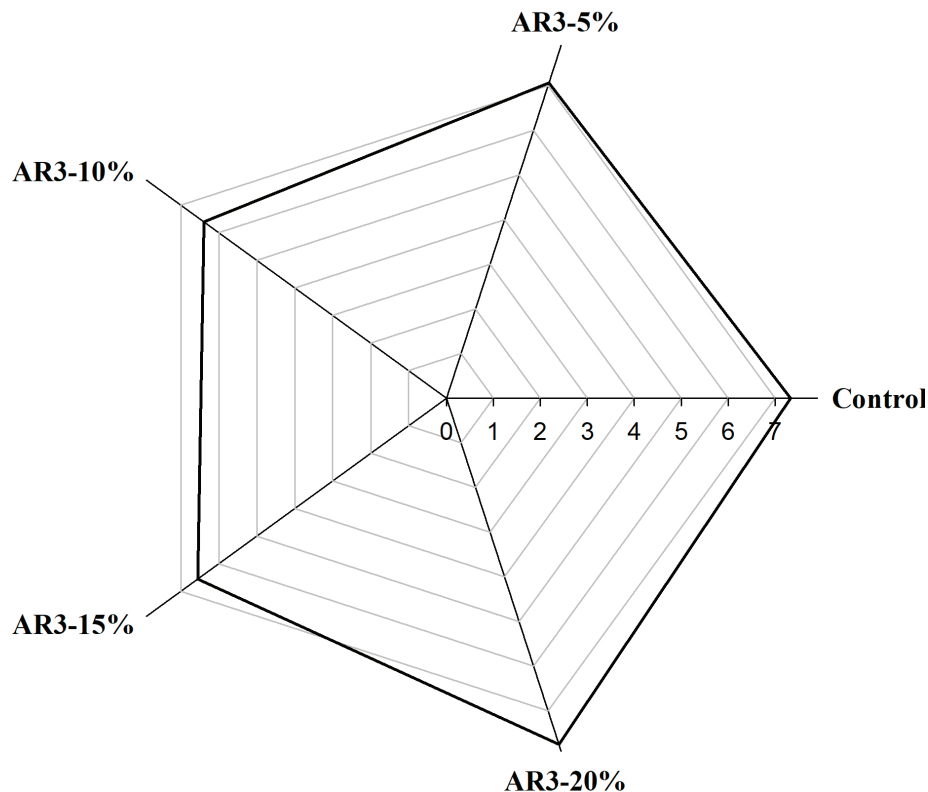


Figura 4. Puntaje comparativo de la evaluación sensorial de las galletas obtenido utilizando escala hedónica de 9 puntos: 1 = Disgusta muchísimo, 5 = Ni gusta ni disgusta, 9 = Gusta muchísimo. Control = Galleta sin adición de almidón resistente tipo 3, AR3-5 % = Galleta adicionada con 5 % de almidón resistente tipo 3, AR3-10 % = Galleta adicionada con 10 % de almidón resistente tipo 3, AR3-15 % = Galleta adicionada con 15 % de almidón resistente tipo 3 y AR3-20 % = Galleta adicionada con 20 % de almidón resistente tipo 3.

Figure 4. Comparative score of the cookies sensory evaluation using 9-points hedonic scale: 1 = Completely dislike, 5 = Neither like nor dislike, 9 = Completely like. Control = Cookie without resistant starch type 3, AR3-5 % = Cookie added at 5 % with resistant starch type 3, AR3-10 % = Cookie added at 10 % with resistant starch type 3, AR3-15 % = Cookie added at 15 % with resistant starch type 3 and AR3-20 % = Cookie added at 20 % with resistant starch type 3.

mostrados, obtenidos de los comentarios de la evaluación); mientras que al incrementar la cantidad de AR3 al 20 % (AR3-20 %), la mayoría de los evaluadores optó por seleccionar esta formulación como adecuada al paladar. Baixauli *et al.* (2007) reportaron en un estudio sensorial, que la presencia de AR afectó las propiedades de textura en panes tipo "muffin" lo cual fue percibido por una cierta sensación de arenosidad, similar a lo encontrado en nuestro estudio. Finalmente, estos investigadores concluyeron que estas características no afectaron "la aceptabilidad total" de estos productos por los consumidores.

CONCLUSIONES

Se obtuvo almidón resistente tipo 3 (AR3) a partir de harina de avena mediante un proceso hidrotérmico de autoclaveado. Los análisis de textura indicaron que la adición de AR3 incrementó la fracturabilidad, dureza y masticabilidad de las masas. La dureza de la masa se reflejó en la dureza de las galletas, ya que está incrementó con la concentración de AR3. Las pruebas viscoelásticas indicaron que el módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') se incrementaron con la adición de AR3, lo cual pudo deberse a la formación de estructuras amorfas y una menor absorción de agua (ambos fenómenos debidos a la presencia de AR3). Las pruebas sensoriales mostraron una mayor preferencia por la galleta con la mayor cantidad (20 %) de AR3; siendo esta formulación la que presentó la textura con la mayor dureza. En general, se obtuvo un alimento funcional mediante una galleta enriquecida con AR3 de avena, sin que se modificaran de manera significativa los atributos de calidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ing. Ángel Esparza Chávez†, al Ing. Arturo Ramos Martínez y a la Ing. Irma Graciela Flores Cortés por sus asistencias técnicas, y se agradece al Fondo Mixto CONACYT-Chihuahua (clave CHIH-2009-C02-126281). Este trabajo es un producto del Grupo de Investigación (GI) en Carbohidratos, Empaques y Alimentos Funcionales (CEAF) del CIAD-Cuauhtémoc, Chihuahua, México, liderado por el Dr. Paul Baruk Zamudio Flores.

REFERENCIAS

- AACC. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of Analysis, 11 th Ed. Method 76-13.01. Total starch assay procedure (megazyme amyloglucosidase/alpha-amylase method). First approval November 8, 1995; Reapproval November 3, 1999. Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, U.S.A. 2010
- Adebowale, K.O., Adeniyi Afolabi, T. y Lawal, O.S. 2002. Isolation, chemical modification and physicochemical characterisation of Bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*) starch and flour. *Food Chemistry*. 78(3): 305-311.
- Agrahar-Murugkar, D., Dwivedi, S., Dixit-Bajpai, P. y Kumar, M. 2018. Effect of natural fortification with calcium and protein rich ingredients on texture, nutritional quality and sensory acceptance of cookies. *Nutrition & Food Science*. 48(5): 807-818.
- Akhtar, M. y Dickinson, E. 2007. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 21(4): 607-616.
- Angioloni, A., Balestra, F., Pinnavaia, G.G. y Rosa, M.D. 2008. Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behaviour. *Journal of Food Engineering*. 87(4): 527-531.
- Aparicio-Saguilán, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., García-Suárez, F., Gutiérrez-Meraz, F. y Bello-Pérez, L.A. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *Starch-Stärke*. 57(9): 405-412.
- Aparicio-Saguilán, A., Gutiérrez-Meraz, F., García-Suárez, F.J., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Physicochemical and functional properties of cross-linked banana resistant starch. Effect of pressure cooking. *Starch - Stärke*. 60(6): 286-291.
- Aparicio-Saguilán, A., Sáyago-Ayerdi, S.G., Vargas-Torres, A., Tovar, J., Ascencio-Otero, T.E. y Bello-Pérez, L.A. 2007. Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(3): 175-181.
- Ashwar, B.A., Gani, A., Shah, A., Wani, I.A. y Masoodi, F.A. 2016. Preparation, health benefits and applications of resistant starch—A review. *Starch - Stärke*. 68(3-4): 287-301.
- Baixauli, R., Sanz, T., Salvador, A. y Fiszman, S.M. 2007. Influence of the dosing process on the rheological and microstructural properties of a bakery product. *Food Hydrocolloids*. 21(2): 230-236.
- Berry, C.S. 1986. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*. 4(4): 301-314.
- Bhattacharya, M., Langstaff, T.M. y Berzonsky, W.A. 2003. Effect of frozen storage and freeze-thaw cycles on the rheological and baking properties of frozen doughs. *Food Research International*. 36(4): 365-372.
- Doğan, İ.S. 2002. Dynamic rheological properties of dough as affected by amylases from various sources. *Food / Nahrung*. 46(6): 399-403.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M. y Cummings, J.H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European journal of clinical nutrition*. 46 Suppl 2: S33-50.
- Fox, E., Shotton, K. y Ulrich, C. 1995. Sigma-Stat: Manual del usuario, versión 2.1 para Windows 95 NT y 3.1. Editorial Jandel Scientific Co. EUA.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E. y Pérez-Álvarez, J.A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*. 43(4): 931-942.
- Galdeano, M.C. y Grossmann, M.V.E. 2006. Oat hulls treated with alkaline hydrogen peroxide associated with extrusion as fiber source in cookies. *Food Science and Technology*. 26: 123-126.
- Giuberti, G., Marti, A., Fortunati, P. y Gallo, A. 2017. Gluten free rice cookies with resistant starch ingredients from modified waxy rice starches: Nutritional aspects and textural characteristics. *Journal of Cereal Science*. 76: 157-164.
- González-Soto, R.A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, R. y Bello-Pérez, L.A. 2004. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch - Stärke*. 56(10): 495-499.

- Goñi, I., García-Diz, L., Mañas, E. y Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*. 56(4): 445-449.
- Holm, J., Hagander, B., Björck, I., Eliasson, A.C. y Lundquist, I. 1989. The effect of various thermal processes on the glycemic response to whole grain wheat products in humans and rats. *The Journal of Nutrition*. 119(11): 1631-1638.
- Hong, S.R. y Yoo, B. 2012. Effect of resistant starch (RS3) addition on rheological properties of wheat flour. *Starch - Stärke*. 64(7): 511-516.
- Kahraman, K., Aktas-Akylz, E., Ozturk, S. y Koxsel, H. 2019. Effect of different resistant starch sources and wheat bran on dietary fibre content and *in vitro* glycaemic index values of cookies. *Journal of Cereal Science*. 90: 102851.
- Kaur, P., Sharma, P., Kumar, V., Panghal, A., Kaur, J. y Gat, Y. 2019. Effect of addition of flaxseed flour on phytochemical, physicochemical, nutritional, and textural properties of cookies. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 18(4): 372-377.
- Kim, N.H., Kim, J.H., Lee, S., Lee, H., Yoon, J.W., Wang, R. y Yoo, S.H. 2010. Combined effect of autoclaving-cooling and cross-linking treatments of normal corn starch on the resistant starch formation and physicochemical properties. *Starch - Stärke*. 62(7): 358-363.
- Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R. y Juszcak, L. 2009. The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. *Food Hydrocolloids*. 23(3): 988-995.
- Kuakpetoon, D. y Wang, Y.J. 2001. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. *Starch - Stärke*. 53(5): 211-218.
- Laguna, L., Hernández, M.J., Salvador, A. y Sanz, T. 2013. Study on resistant starch functionality in short dough biscuits by oscillatory and creep and recovery tests. *Food and Bioprocess Technology*. 6(5): 1312-1320.
- Lee, Y.J., Kim, D.-B., Lee, O.H. y Yoon, W.B. 2016. Characterizing texture, color and sensory attributes of cookies made with jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) flour using a mixture design and browning reaction kinetics. *International Journal of Food Engineering*. 12(2): 107-126.
- Morris, G.A., Sims, I.M., Robertson, A.J. y Furneaux, R.H. 2004. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glyco-conjugates. *Food Hydrocolloids*. 18(6): 1007-1014.
- Nugent, A.P. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*. 30(1): 27-54.
- Núñez-Santiago, M.C., Méndez-Montealvo, M.G. y Solorza-Feria, J. 2001. Introducción a la Reología. Instituto Politécnico Nacional. México, DF. 43-49 y 87-91.
- O'Regan, J. y Mulvihill, D.M. 2010. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*. 43(1): 224-231.
- Oh, J.H., Kim, M.J. y Yoo, B. 2010. Dynamic rheological properties of rice flour-starch blends. *Starch-Stärke*. 62(6): 321-325.
- Olinger, P.M. y Pepper, T. 2001. Xylitol. En: *Alternative Sweeteners*. L. O. Nabors (eds.). pp. 335-365. Marcel Dekker. Basel, New York, USA.
- Piteira, M.F., Maia, J.M., Raymundo, A. y Sousa, I. 2006. Extensional flow behaviour of natural fibre-filled dough and its relationship with structure and properties. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 137(1): 72-80.
- Rehman, Z.U. y Shah, W.H. 2005. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*. 91(2): 327-331.
- Rutenberg, M.W. y Solarek, D. 1984. Starch derivatives: Production and uses. En: *Starch: Chemistry and Technology*. R. L. Whistler, J. N. Bemiller y E. F. Paschall (eds.). 2 ed., pp. 311-388. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 2006. Resistant Starch. A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(1): 1-17.
- Salvador, A., Sanz, T. y Fiszman, S.M. 2006. Dynamic rheological characteristics of wheat flour-water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast. *Food Hydrocolloids*. 20(6): 780-786.
- Sánchez-Rivera, M.M., García-Suárez, F.J.L., Velázquez del Valle, M., Gutierrez-Meraz, F. y Bello-Pérez, L.A. 2005. Partial characterization of banana starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*. 62(1): 50-56.
- Sanz, T., Fernández, M.A., Salvador, A., Muñoz, J. y Fiszman, S.M. 2005. Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effect on a batter formula. *Food Hydrocolloids*. 19(1): 141-147.
- Shepherd, R., Robertson, A. y Ofman, D. 2000. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*. 14(4): 281-286.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N. y Singh Gill, B. 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*. 81(2): 219-231.
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kijroongrojana, K. y Prodpran, T. 2019. Chemical, physical, rheological and sensory properties of biscuit fortified with protein hydrolysate from cephalothorax of Pacific white shrimp. *Journal of Food Science and Technology*. 56(3): 1145-1154.
- Tecante, A. 2001. Viscoelasticity. En: *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. G. V. Barbosa-Cánovas, P. Juliano y M. A. Rao (eds.). pp. 292-304. Eolss Publishers Cp. Ltd. L. USA.
- Unlu, E. y Faller, J.F. 1998. Formation of resistant starch by a twin-screw extruder. *Cereal Chemistry*. 75(3): 346-350.
- Utrilla-Coello, R.G., Agama-Acevedo, E., Osorio-Díaz, P., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. 2011. Composition and starch digestibility of whole grain bars containing maize or unripe banana flours. *Starch - Stärke*. 63(7): 416-423.
- Varghese, C., Wolodko, J., Chen, L., Doschak, M., Srivastav, P.P. y Roopesh, M.S. 2020. Influence of Selected Product and Process Parameters on Microstructure, Rheological, and Textural Properties of 3D Printed Cookies. *Foods*. 9(7): 907.
- Villanueva, M., Pérez-Quirce, S., Collar, C. y Ronda, F. 2018. Impact of acidification and protein fortification on rheological and thermal properties of wheat, corn, potato and tapioca starch-based gluten-free bread doughs. *LWT-Food Science and Technology*. 96: 446-454.
- Walpole, E.R., Myers, H.R. y Myers, L.S. 1999. Probabilidad y estadística para ingenieros. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A. México.
- Witczak, M., Juszcak, L., Ziobro, R. y Korus, J. 2012. Influence of modified starches on properties of gluten-free dough and bread. Part I: Rheological and thermal properties of gluten-free dough. *Food Hydrocolloids*. 28(2): 353-360.

Wong, T.H.T. y Louie, J.C.Y. 2016. The relationship between resistant starch and glycemic control: A review on current evidence and possible mechanisms. *Starch - Stärke*. 69(7-8): 1-9.

Zamudio-Flores, P.B., Bello-Pérez, L.A., Vargas-Torres, A., Hernández-Uribe, J.P. y Romero-Bastida, C.A. 2007. Partial characterization of films prepared with oxidized banana starch. *Agrociencia*. 41: 837-844.

Zamudio-Flores, P.B., Tirado-Gallegos, J.M., Monter-Miranda, J.G., Aparicio-Saguilán, A., Torruco-Uco, J.G., Salgado-Delgado, R. y Bello-Pérez, L.A. 2015. Digestibilidad *in vitro* y propiedades térmicas, morfológicas y funcionales de harinas y almidones de avenas de diferentes variedades. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(1): 81-97.

Zhang, H., Yin, L., Zheng, Y. y Shen, J. 2016. Rheological, textural, and enzymatic hydrolysis properties of chickpea starch from a Chinese cultivar. *Food Hydrocolloids*. 54: 23-29.

Composición nutricional en granos de triticales (X. *Triticosecale* Wittmack) y usos alimentarios

Nutritional composition in grains of triticales (X. *Triticosecale* Wittmack) and food uses

Alejandro García Ramírez¹, Gilberto Rodríguez Pérez^{1*}, Felipe de Jesús Reynaga Franco¹ y Francisco Cervantes Ortiz²

¹ Tecnológico Nacional de México-Valle del Yaqui. Av. Tecnológico, Block 611, Valle del Yaqui, Sonora. C.P. 85276; Alejandro.gr@vyaqui.tecnm.mx; gilberto.rp@vyaqui.tecnm.mx; fe-lipe.rf@vyaqui.tecnm.mx

² Tecnológico Nacional de México-Roque. km 8 carretera Celaya-Juventino Rosas. C.P. 38110. Celaya, Guanajuato; francisco.co@roque.tecnm.mx

RESUMEN

La necesidad de investigar y evaluar la alternativa de producir triticales en México, para luego, incorporarlo a la cadena agroalimentaria en la alimentación humana es importante, debido a su contenido de proteína (alrededor de 20 % más que el trigo), sumado al mejor balance de aminoácidos y a su grano más rico en fósforo que el grano de trigo. El objetivo de esta investigación fue identificar líneas de triticales (X. *Triticosecale* Wittmack) con base en las propiedades físicas y químicas del grano con valor para la industria alimentaria. Se evaluaron 20 líneas élite de triticales primaverales del programa de investigación del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). El estudio se realizó en 2017 en Celaya, Guanajuato, México. El experimento se aleatorizó en un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, cada unidad experimental correspondió a cada línea, las variables medidas fueron: peso de mil granos (PMG) peso hectolítrico (PH), humedad, cenizas, grasa, fibra, proteína y carbohidratos fueron determinadas en el laboratorio de análisis de alimentos del TecNM-Roque. Los resultados mostraron diferencias estadísticas entre líneas; se encontraron mayores contenidos de PMG (45.85 g), PH (78.8 kg hL⁻¹) en L-18 y L-20 respectivamente, en grasa, fibra, proteínas y carbohidratos las líneas L-17, L-18 y L-20 obtuvieron mayores promedios, en cenizas el 75 % de las líneas mostraron valores inferiores al 2.0 %.

Palabras clave: X. *Triticosecale* Wittmack, propiedades fisicoquímicas, calidad industrial

ABSTRACT

The need to investigate and evaluate the alternative of producing triticales in Mexico, to later incorporate it into the agri-food chain for human consumption is important, due to its good protein content (around 20 % more than wheat), added to the better balance of amino acids and its grain is richer in phosphorus than wheat grain. The objective of this research was to identify lines of triticales (X. *Triticosecale* Wittmack) based on the physical and chemical properties of the grain with value for the food industry. Twenty elite lines of spring triticales from the CIMMYT (International Maize and Wheat

Improvement Center) research program was evaluated. The study was carried out in 2018 in Celaya, Guanajuato, Mexico, the experiment was randomized in a completely randomized experimental design with six repetitions, each experimental unit was each line, the variables measured were: thousand grain weight (PMG) hectoliter weight (PH), humidity, ashes, fat, fiber, protein and carbohydrates were determined in the food analysis laboratory of TecNM-Roque. The results showed statistical differences between lines; higher contents of PMG (45.85 g), PH (78.8 Kg hL⁻¹) were found in L-18 and L-20 respectively, in fat, fiber, carbohydrate proteins the lines L-17, L-18 and L-20 obtained higher averages, in ash 75 % of the lines showed values lower than 2.0 %.

Keywords: X. *Triticosecale* Wittmack, physicochemical properties, industrial quality

INTRODUCCIÓN

El triticales (X. *Triticosecale* Wittmack), un cereal artificial de hibridación de trigo y centeno, se utiliza principalmente como alimento para animales; en los últimos años se ha incrementado el interés en utilizar el triticales para la producción de alimentos (Zhu, 2018). Debido a su variabilidad genética y su composición nutricional en el grano se han realizado estudios en diversos productos alimenticios y bebidas de triticales, incluidos los productos de panadería como galletas, pastas, panes y maltas. Existen diversas investigaciones que se han realizado de la composición nutricional y los diversos usos alimentarios del triticales debido a su amplia variación en la composición química del grano, lo que es importante realizar estudios de este cultivo por las propiedades físico químicas que contiene el grano como una alternativa entre los cereales para diversas aplicaciones de alimentos (Zhu, 2018).

El grano de triticales y la harina constituyen una buena fuente de vitaminas y minerales (Pruska *et al.*, 2017), en general, desde el punto de vista de calidad, los triticales tienen mayor cantidad de proteínas, alrededor de 20 % más que el trigo con un promedio de 3.4 % de lisina en la proteína (Zhu, 2018), que variedades de trigo. Su proteína es más digestiva lo que es valioso por tratarse de un aminoácido esencial que el organismo no sintetiza, por lo tanto, se trata de un produc-

to de gran interés para la alimentación humana. Aunque sus características, tales como la textura del grano y a veces el llenado del grano, juegan en su contra durante la comercialización, puesto que los molinos saben que el rendimiento de harina es inferior al trigo (Pruska *et al.*, 2017). La extracción de harina del grano de triticales puede llegar hasta un 65 % que representa entre 70 y 75 % del peso inicial del grano y comprende aproximadamente el 70 % de las proteínas totales y el 80 % del almidón, aunque es muy variable según la variedad, condiciones de manejo y cosecha (Riasat *et al.*, 2019).

De acuerdo a su valor nutricional, el triticales puede convertirse en un grano de suma importancia para la alimentación humana. Sus factores nutricionales más importantes son el contenido de almidón y la cantidad y calidad de las proteínas como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la digestibilidad del triticales es similar a la del trigo y el valor biológico y la utilización de proteínas es un 10 % superior (Riasat *et al.*, 2019). Los granos del triticales pueden ser comparados con el trigo, por obtener buen potencial de rendimiento en ambientes sujetos a déficit hídrico.

Los progresos logrados en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) se debieron principalmente al aumento del índice de cosecha, mayor número de granos y espigas, peso hectolítrico y a la disminución de la altura de planta (Noriega-Carmona *et al.*, 2019). Además, la utilidad de las harinas para fabricar galletas, pastas y pan de caja ha sido probada. Por su parte Oliete *et al.* (2010) mencionaron que el triticales puede considerarse para la alimentación humana, sin embargo, se deben aumentar los rendimientos de este cultivo en la calidad de las harinas. El rendimiento en harina y su calidad dependen de la variedad y de las condiciones de cultivo, así como la viscosidad de las harinas. Las harinas de triticales son un poco más oscuras que las de trigo y más claras que las de centeno. El color constituye uno de los principales obstáculos para su aceptación en panadería. El rendimiento en molino del triticales es inferior al del trigo. Esto se debe fundamentalmente a la forma alargada y arrugada del grano, que implica una mayor relación entre la superficie exterior y el volumen, y a las características excesivamente blandas del endospermo (Riasat *et al.*, 2019).

En México, la selección de genotipos de triticales con granos para la molienda son escasos, los estudios se han enfocado a la producción de forraje y grano. Sin embargo, Ammar *et al.* (2004) señalaron que, se siguen buscando los medios de elevar el rendimiento, mejorar la adaptación y su calidad industrial en México. En la actualidad se dedica mayor atención a desarrollar variedades que prosperen en ambientes agrónomicamente subóptimos y que presenten resistencia a enfermedades. Cuando se mejoran características relacionadas con la productividad, suele intentarse una selección indirecta a través de los componentes de rendimiento y caracteres fisicoquímicos (Aisawi *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista predictivo de la selección, es importante saber que la planta de triticales tiene semejanzas morfológicas generales con la planta de trigo, aunque es más robusto y vigoroso y con una espiga más grande (Mon-

temayor *et al.*, 2015). Durante mucho tiempo se trabajó en la combinación de la rusticidad, el vigor y la tolerancia a suelos pobres del centeno, con la calidad de los granos de trigo. Esto permitiría extender la producción de granos a regiones que por factores climáticos y características del suelo son consideradas marginales para trigo, especialmente en México (Montemayor *et al.*, 2015). En aquellas regiones de México donde las enfermedades o las condiciones adversas del suelo restringen el cultivo de trigo, el triticales se ha revelado como un grano alternativo superior para la alimentación humana, sobre todo porque ha demostrado una gran capacidad de adaptación a los suelos ácidos y salinos con la necesidad de contar con variedades de mayores y mejores bondades que satisfagan las necesidades y los requerimientos de la industria (Pattison *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar líneas de triticales en base a sus propiedades físicas y químicas del grano con valor a la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético y ubicación de los experimentos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de industrias alimentarias del Tecnológico Nacional de México, campus Roque en Celaya, Guanajuato, México, en el 2018 con las siguientes coordenadas geográficas, a 20° 31' Latitud Norte, 100° 45' Longitud Oeste y 1765 msnm. El material genético que se utilizó fueron 20 líneas élite de triticales de hábito primaveral de generación F_8 que fueron seleccionadas en el campo experimental del CIMMYT, Norman E. Borlaug en Ciudad Obregón, Sonora, del vivero YTCL-2015 en abril 2017 (Tabla 1). Posteriormente estas líneas fueron sembradas en el campo experimental del Tecnológico Nacional de México-Roque en noviembre 2017, donde se obtuvo información de rendimiento de grano, altura de planta, número de espigas, peso de mil granos y peso hectolítrico principalmente. Posteriormente a la semilla de cada línea se realizaron los análisis fisicoquímicos en el laboratorio de industrias alimentarias del TecNM-Roque, las variables evaluadas fueron: peso de mil granos (PMG), peso hectolítrico (PH), humedad, cenizas, grasa, fibra, proteína y carbohidratos.

Análisis fisicoquímicos

Para el peso de 1000 granos (PMG), la determinación se realizó por triplicado mediante el conteo de los granos donde posteriormente fueron pesados en una báscula digital, al final el dato se expresó en gramos.

Para peso hectolítrico (PH) se utilizó la metodología de la American Association of Cereal Chemists (AOAC, 2012), al dividir el peso de los granos entre el volumen del recipiente y relacionado al volumen de 100 L. Las mediciones se realizaron con 10 repeticiones utilizando 200 g por muestra lo cual fue expresado en kg hL^{-1} .

La humedad se determinó por medio de termo balanza marca ADAM con capacidad máxima de 200 g. Se abrió la unidad de calentamiento, colocándose en una charola de aluminio, posteriormente se taró el equipo poniendo los

Tabla 1. Genealogía del material genético de las 20 líneas élite de triticales primaverales en el estado de Guanajuato.**Table 1.** Genealogy of the genetic material of the 20 elite lines of spring triticales in the state of Guanajuato.

Línea	Genealogía	Línea	Genealogía
1	CTSS99Y00246S-1Y-0M-0Y-5B-1Y-0B	11	CTSS07Y00056S-27Y-010M-6Y-3M-1Y-0B
2	CTSS02B00380S-6Y-3M-4Y-2M-1Y-0M	12	CTSS07Y00076S-12Y-010M-26Y-1M-4Y-0B
3	CTSS02B00413S-22Y-2M-3Y-2M-1Y-0M	13	CTSS07Y00103S-23Y-010M-4Y-1M-2Y-0B
4	CTSS03Y00100T-050TOPY-49M-1Y-06Y	14	CTSS08Y00155T-099Y-016M-17Y-099M-4Y
5	CTSS05Y00094S-020Y-8M-4Y-0M-1Y-0M	15	CTSS08Y00168T-099Y-024M-5Y-099M-1Y
6	CTSS04B00008S-020Y-24M-2Y-0M-2Y-0M	16	CTSS08Y00035S-099Y-026M-5Y-099M-5Y
7	CTSS04B00035S-020Y-29M-4Y-0M-2Y-0M	17	CTSS08Y00035S-099Y-026M-19Y-099M-2Y
8	CTSS07Y00001S-17Y-010M-6Y-3M-3Y-0B	18	CTSS08Y00054S-099Y-021M-2Y-099M-9Y
9	CTSS07Y00009S-26Y-010M-9Y-1M-3Y-0B	19	CTSS08Y00117S-099Y-032M-2Y-099M-15Y
10	CTSS07Y00052S-3Y-010M-3Y-4M-2Y-0B	20	CTSS08Y00130S-099Y-037M-9Y-099M-5Y

granos de cada línea de triticales para pesar de 3 a 5 g por cada línea, después de unos minutos se dio la señal acústica, para determinar la lectura en pantalla, marcando peso inicial, peso final y el % de humedad. Se abrió el equipo y se retiró la muestra para proceder a realizar el procedimiento de cada línea evitando cualquier fuente de calor durante el proceso, ya que esto puede producir una pérdida de humedad, se registraron los datos y se realizaron tres repeticiones.

El contenido de proteína cruda se calculó a partir del nitrógeno total utilizando el método de Kjeldhal. La digestión se realizó con ácido sulfúrico concentrado y en la destilación se utilizó hidróxido de sodio al 40 %. Para la titulación se utilizó una solución valorada de ácido sulfúrico, método oficial de la AOAC (2012).

La determinación de grasa se realizó de acuerdo con el método 923.03 de la AOAC (2012). Las extracciones se realizaron en muestras de 1 g de harina que pasaron a través de una malla 80 (0.180 mm). Se utilizó un equipo Soxhlet System HT 1043, con éter de petróleo como disolvente, la determinación se realizó por triplicado.

El análisis de cenizas se realizó en una mufla según la AOAC (2012) con temperaturas de 550°C.

Los carbohidratos se determinaron por diferencia, restando a 100 los porcentajes calculados para cada nutriente, los valores se expresaron en g kg⁻¹.

La determinación de fibra se basó en el método de digestión ácida y alcalina de 2.0 g de muestra desgrasada. La muestra se transfirió a un vaso de 600 mL para evitar la contaminación con la fibra de papel, se agregó 1.0 g de asbesto preparado y 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25 % hirviendo. Posteriormente se giró el vaso periódicamente para evitar que los sólidos se adhirieran a las paredes. Después se retiró el vaso y se filtró, posteriormente se lavó el residuo varias veces hasta que las aguas del lavado presentaran un pH igual al agua destilada. Al final, se calcinó a 600 °C durante 30 min para enfriar y determinar su masa.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza completamente al azar con seis repeticiones y en las variables que presentaron diferencias significativas, se procedió a realizar la comparación de medias diferencia mínima significativa (DMS) $P \leq 0.05$. En la

caracterización de las líneas de triticales se generó una matriz promediando los datos de todas las variables en estudio. Se utilizó el método de UPGMA (media métrica no ponderada) para calcular las distancias y generar los grupos más compactos y homogéneos y así diferenciar los grupos dentro de las líneas de triticales, el criterio del corte fue al visualizar los grupos que se formaron de acuerdo a la distancia nueve. Este método es eficiente, ya que genera conglomerados equilibrados y de tamaño pequeño, además de que tiene interpretación sencilla (Núñez y Escobedo, 2011).

El método de UPGMA asume que las líneas son grupos por sí mismas, luego relaciona los grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo, para generar el dendograma se utilizó el programa Statistic (versión 6.0). Para el gráfico se generó una matriz de datos X (IXJ) mediante los vectores $a_1, a_2, a_3, \dots, a_i$ para filas y $b_1, b_2, b_3, \dots, b_j$ para las columnas de X, de forma tal que el producto interno aproxime el elemento X_{ij} de la matriz de partida lo mejor posible, el cual considera el análisis para generar el biplot.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Tabla 2, el análisis de varianza indicó diferencias significativas para líneas en todas las variables en estudio. Los efectos que contribuyeron más a la variación total entre las líneas de acuerdo con los cuadrados medios del error fueron en carbohidratos, peso de mil granos y peso hectolítrico, humedad y proteínas. Esto fue debido a la expresión entre las líneas (Fraś *et al.*, 2016), donde se encontraron diferencias en propiedades físicas como PMG y PH en líneas avanzadas de triticales.

Las líneas L-18, L-17, L-14, L-19 y L-20 mostraron mayores promedios en PMG y PH, (Tabla 3), por lo que al peso de grano y hectolítrico suelen considerarse como un indicador del potencial de rendimiento de grano que posee un grupo de variedades o líneas. Kandrokov *et al.* (2019), mencionaron que debe tenerse en cuenta que la morfología del grano puede ser alterada negativamente por siembras tardías, deficiencia de nitrógeno, deficiencia en el abasto de agua y en el llenado de grano por temperaturas altas o bajas. Los resulta-

Tabla 2. Análisis de varianza (cuadrados medios) en 20 líneas élite de triticales primaverales evaluadas en 2018, de las variables fisicoquímicas en el estado de Guanajuato.

Table 2. Analysis of variance (mean squares) in 20 elite lines of spring triticales evaluated in 2018, of the physico-chemical variables in the state of Guanajuato.

FV	GL	PMG (g)	PH (Kg hL ⁻¹)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Fibra (g)	Proteína (g)	Carbohidratos (g)
Líneas	19	32.56**	20.52**	1.04*	0.10*	8.01**	0.19**	33.60**	135.82**
Error	100	10.17	6.26	6.12	0.08	1.36	0.01	3.78	32.39
Total	119	17.45	10.78	7.14	0.08	2.42	0.04	8.53	48.90
CV (%)		7.98	3.33	16.07	14.03	12.45	2.9	15.17	9.09

Tabla 3. Comparación de medias (DMS) de las 20 líneas élite de triticales primaverales de las variables fisicoquímicas, evaluadas en 2018 en el estado de Guanajuato.

Table 3. Comparison of means (DMS) of the 20 elite lines of spring triticales of the physicochemical variables, evaluated in 2018 in the state of Guanajuato.

Línea	PMG (g)	PH (Kg hL ⁻¹)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Fibra (g)	Proteína (g)	Carbohidratos (g)
1	38.13 ± 0.62 ^{ab}	68.36 ± 0.96 ^c	15.56 ± 0.21 ^a	2.24 ± 0.23 ^a	2.18 ± 0.11 ^{bc}	3.32 ± 0.13 ^k	9.15 ± 0.11 ^f	61.97 ± 0.70 ^{abcde}
2	39.01 ± 0.62 ^{ab}	73.96 ± 0.99 ^{abc}	15.85 ± 0.76 ^a	1.92 ± 0.01 ^c	2.34 ± 0.78 ^{abc}	3.51 ± 0.04 ^{ghijk}	15.54 ± 0.23 ^{ab}	54.16 ± 0.26 ^e
3	42.79 ± 0.48 ^b	75.36 ± 0.48 ^{abc}	14.78 ± 0.78 ^{ab}	1.93 ± 0.02 ^c	1.23 ± 0.58 ^c	3.57 ± 0.13 ^{fghij}	13.02 ± 0.45 ^{abcdef}	64.85 ± 0.99 ^{abcde}
4	36.23 ± 0.30 ^{ab}	73.26 ± 0.64 ^{abc}	13.67 ± 0.30 ^{abc}	1.92 ± 0.04 ^c	3.47 ± 0.23 ^{abc}	3.38 ± 0.16 ^{jk}	11.12 ± 0.34 ^{cdef}	66.13 ± 0.07 ^{abcd}
5	35.83 ± 0.67 ^b	69.53 ± 0.45 ^{bc}	13.24 ± 0.36 ^{bc}	1.90 ± 0.17 ^{cd}	3.15 ± 0.59 ^{abc}	3.61 ± 0.16 ^{efghi}	13.68 ± 0.34 ^{abc}	58.21 ± 0.17 ^{abcde}
6	42.92 ± 0.96 ^{ab}	75.82 ± 0.21 ^{abc}	12.73 ± 0.09 ^{bc}	2.14 ± 0.11 ^{ab}	2.31 ± 0.24 ^{abc}	3.39 ± 0.32 ^{ijk}	9.43 ± 0.11 ^{def}	63.83 ± 0.28 ^{abcde}
7	45.69 ± 0.63 ^{ab}	76.11 ± 0.33 ^{abc}	12.86 ± 0.17 ^{bc}	1.98 ± 0.02 ^{abc}	1.97 ± 0.41 ^c	3.84 ± 0.13 ^{abc}	13.49 ± 0.11 ^{abcd}	55.79 ± 0.64 ^{cde}
8	37.73 ± 0.06 ^{ab}	74.23 ± 0.16 ^{abc}	15.93 ± 0.77 ^a	1.95 ± 0.08 ^{bc}	1.39 ± 0.22 ^c	3.65 ± 0.14 ^{defgh}	13.32 ± 0.71 ^{abcde}	66.79 ± 0.62 ^{abcd}
9	37.64 ± 0.14 ^{ab}	74.46 ± 0.56 ^{abc}	14.84 ± 0.28 ^{ab}	2.07 ± 0.08 ^{abc}	4.53 ± 0.81 ^{ab}	3.45 ± 0.16 ^{hijk}	11.47 ± 0.23 ^{bcdef}	67.397 ± 0.73 ^{abc}
10	43.50 ± 0.25 ^{ab}	76.66 ± 0.45 ^{ab}	13.42 ± 0.57 ^{bc}	1.96 ± 0.22 ^{bc}	3.38 ± 0.79 ^{abc}	3.68 ± 0.09 ^{bcdef}	14.11 ± 0.34 ^{abc}	59.96 ± 0.58 ^{abcde}
11	42.07 ± 0.68 ^{ab}	76.03 ± 0.98 ^{abc}	12.61 ± 0.45 ^{cd}	2.27 ± 0.23 ^a	2.26 ± 0.11 ^{abc}	3.55 ± 0.15 ^{fghij}	9.27 ± 0.23 ^{ef}	63.14 ± 0.07 ^{abcde}
12	38.28 ± 0.62 ^{ab}	73.23 ± 0.35 ^{abc}	14.05 ± 0.57 ^{ab}	1.94 ± 0.01 ^{bc}	2.42 ± 0.78 ^{abc}	3.76 ± 0.04 ^{abcdef}	14.29 ± 0.25 ^{abc}	55.19 ± 0.41 ^{de}
13	39.16 ± 0.67 ^{ab}	76.56 ± 0.99 ^{ab}	13.25 ± 0.86 ^{bc}	1.96 ± 0.08 ^{bc}	1.31 ± 0.52 ^c	3.82 ± 0.14 ^{abcde}	13.19 ± 0.23 ^{abcdef}	66.08 ± 0.77 ^{abcde}
14	42.94 ± 0.64 ^{ab}	77.96 ± 0.48 ^a	12.03 ± 0.28 ^d	1.84 ± 0.06 ^d	2.05 ± 0.84 ^c	3.62 ± 0.16 ^{defgh}	11.26 ± 0.56 ^{cdef}	68.12 ± 0.06 ^{ab}
15	36.38 ± 0.28 ^{ab}	75.86 ± 0.24 ^{abc}	12.43 ± 0.83 ^{cd}	1.92 ± 0.18 ^c	3.24 ± 0.60 ^{abc}	3.84 ± 0.18 ^{abcd}	13.86 ± 0.11 ^{abc}	59.32 ± 0.36 ^{abcde}
16	35.98 ± 0.53 ^{ab}	75.86 ± 0.56 ^{abc}	13.61 ± 0.87 ^{abc}	2.17 ± 0.25 ^{ab}	2.39 ± 0.65 ^{abc}	3.59 ± 0.19 ^{fghij}	9.55 ± 0.23 ^{def}	65.04 ± 0.54 ^{abcde}
17	43.05 ± 0.97 ^{ab}	78.06 ± 0.45 ^a	10.96 ± 0.81 ^d	1.82 ± 0.21 ^d	4.72 ± 0.06 ^a	3.86 ± 0.04 ^{abc}	16.61 ± 0.68 ^a	72.24 ± 0.77 ^a
18	45.84 ± 0.62 ^a	77.43 ± 0.53 ^a	12.1 ± 0.66 ^{cd}	1.84 ± 0.15 ^d	4.64 ± 0.24 ^a	3.91 ± 0.13 ^{ab}	16.39 ± 0.23 ^a	68.06 ± 0.00 ^{ab}
19	37.89 ± 0.06 ^{ab}	75.26 ± 0.52 ^{abc}	13.04 ± 0.91 ^{bc}	1.85 ± 0.09 ^d	1.47 ± 0.21 ^c	3.73 ± 0.15 ^{bcdef}	11.61 ± 0.11 ^{bcdef}	56.85 ± 0.35 ^{bcde}
20	37.81 ± 0.37 ^{ab}	78.8 ± 0.73 ^a	10.34 ± 0.35 ^d	1.98 ± 0.05 ^{abc}	4.59 ± 0.15 ^{ab}	3.94 ± 0.12 ^a	15.74 ± 0.11 ^a	61.10 ± 0.73 ^{abcde}
DMS (0.05)	9.89	7.76	0.6	0.45	2.45	0.22	4.08	11.96

dos obtenidos fueron debido a las condiciones ambientales en que fueron sembradas las líneas en campo (18 noviembre de 2017). Los resultados indican que el llenado de grano durante el ciclo de siembra fue debido a las 796 horas frío, superando el promedio necesario de 600 horas que requiere el triticale para obtener buen peso hectolítrico y peso de mil granos (CONAGUA, 2018). Se espera que proporcione excelente rendimiento de harinas durante el proceso de molienda en la industria alimentaria. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pomortsev *et al.* (2019) y Giunta *et al.* (2017), quienes mencionan que el mayor peso de grano es fuertemente afectado por factores genéticos y ambientales. Los resultados mostraron que, dentro de la variación total de los valores de estas variables fueron debido a la constitución genética de cada línea, poniendo de manifiesto predecir el comportamiento de las líneas al ser evaluadas.

El contenido de humedad tiene gran relevancia porque contenidos mayores a 14 % favorecen el daño que causa la presencia de microorganismos durante el almacenamiento temporal, por consecuencia afecta la calidad de harinas en la fabricación de subproductos, por lo que es importante identificar genotipos con contenidos menores del 13 % de humedad para evitar presencia de microorganismos que afecten la calidad en harinas (Zhu, 2018).

La humedad en las líneas L-6, L-7, L-11 y L-14 analizadas fue satisfactoria y confiable para realizar un procesamiento en la elaboración de subproductos debido a que presentaron valores inferiores al 13 %. Por otra parte, el contenido de minerales (cenizas) en el grano es importante ya que, si su concentración es alta, sobre todo en granos con bajo peso hectolítrico, puede no ser favorable en la industria alimentaria y animal (Riasat *et al.*, 2019). En esta investigación se encontraron valores superiores de cenizas y peso hectolítrico en la línea L-20, sin embargo, los bajos niveles de cenizas son favorables en virtud que pueden aportar mayor cantidad de minerales para la alimentación. Por otro lado, cuando existen niveles altos en cenizas son particularmente indeseables porque oscurecen la semolina y en mayor grado las pastas alimenticias (Biel *et al.*, 2020). Los niveles de concentración de cenizas en grano que se consideran deseables deben ser menores a 2.0 % (Krasilnikov *et al.*, 2018). Los resultados mostraron que las líneas L-17, L-18, L-19 y L-14 presentaron valores menores a 2 % en cenizas, lo que les hace importantes para la aportación de minerales.

En relación con el contenido de grasas se encontró una variación entre las diez líneas, solo las líneas L-17, L-18 y L-20 mostraron mayores valores. En general, los cereales tienen bajas cantidades de compuestos lipídicos, el triticale se encuentra entre el 1.5 % de grasas (Wang *et al.*, 2021), los cuales están presentes principalmente en el germen y la capa de aleurona del grano. Por lo tanto, las tres líneas de triticale están dentro del intervalo que se conoce para el contenido de grasas en el cereal. A su vez, Pruska *et al.* (2017) mencionaron que se debe considerar aquellos cereales con mayores contenidos de grasas para extender su uso en la alimentación humana al mismo tiempo aumentando los rendimientos

del cultivo y la calidad en sus harinas, dado que las grasas representan la fuente principal de energía procedente de los alimentos, como es el caso de la concentración que tienen algunos cereales en el grano como el trigo y avena.

En el caso de fibra, se encontraron valores superiores en seis líneas (L-13, L-7, L-15, L-12, L-17 y L-20) donde arrojaron valores por arriba de 3.84 y 3.94 g; el rango para esta variable es de 3.1 g en triticales (Peña *et al.*, 2007). En general las 20 líneas representan buena fuente de fibra, que al consumir 5 g o más de fibra por porción en productos elaborados de triticale, puede prevenir el estreñimiento y además contribuye a que los alimentos pasen más rápido a través del estómago y de los intestinos (Wu *et al.*, 2019). Por otra parte, las líneas L-10, L-12, L-2 y L-17 produjeron mayores concentraciones de proteínas desde 14.11 a 16.61 %. Estos valores difirieron notablemente en las cuatro líneas obteniendo porcentajes superiores a lo mencionado por Xiong *et al.* (2022) quienes reportaron que el triticale tiene usualmente un contenido proteico de 14.3 %. Consecuencia de estos resultados indican que los valores de contenido de proteína son deseables para elaborar subproductos con calidad como pastas y galletas con mayor proporción de proteína; así mismo superaran en un 4.61 % más su contenido de proteína que los trigos (12 %). Gulmezoglu *et al.* (2010) reportaron que los triticales contienen una buena fuente de proteínas, carbohidratos y grasas que pueden utilizarse en la alimentación humana en diferentes productos elaborados para la industria alimentaria en pastas, galletas o panes con harinas propias o mezclas con harinas de otros cereales (Krasilnikov *et al.*, 2018).

En relación al contenido de carbohidratos en el grano se observó que en las líneas L-18, L-14, L-17 y L-9 presentaron valores altos de carbohidratos, al comparar estos valores con los obtenidos por Kandrov *et al.* (2021) quienes encontraron valores inferiores a este estudio. En base a lo anterior, se puede decir que los alimentos ricos en hidratos de carbono están presentes en semillas, pastas, panes, galletas, tubérculos entre otros (Pattison *et al.*, 2014). Estos alimentos son muy importantes ya que representan el 55 % del total de alimentos en la dieta de los países desarrollados y más del 80 % en los países subdesarrollados, lo que las líneas con mayores porcentajes de proteínas, carbohidratos, fibras, las convierte en un grano con excelente valor calórico y con posibilidades de ser utilizado en la elaboración de fórmulas alimenticias para humanos y/o animales (Kandrov *et al.* 2021).

El análisis conglomerado clasificó a las 20 líneas de triticales en cuatro grupos con similitud en base a las características fisicoquímicas del grano (Figura 1). El primer grupo lo conformaron las líneas L-17 y L-18, que aportaron mayor PMG y PH, superando a la media general por 5.91 g y 3.66 kg hL⁻¹ respectivamente. Sin embargo, para cenizas, proteínas, fibra y grasa sus valores fueron superiores por lo reportado por Biel *et al.* (2020) siendo aceptables para la industria molinera, en especial para elaboración de pastas, galletas, macarrones y sopas. Chavoushi *et al.* (2020) refirieron que una buena calidad de harinas en granos de triticales debe ser cuando éstos presenten valores superiores de 14.3 % en proteína, menores de 2.0 % de cenizas y mayores de 1.5 % de grasa.

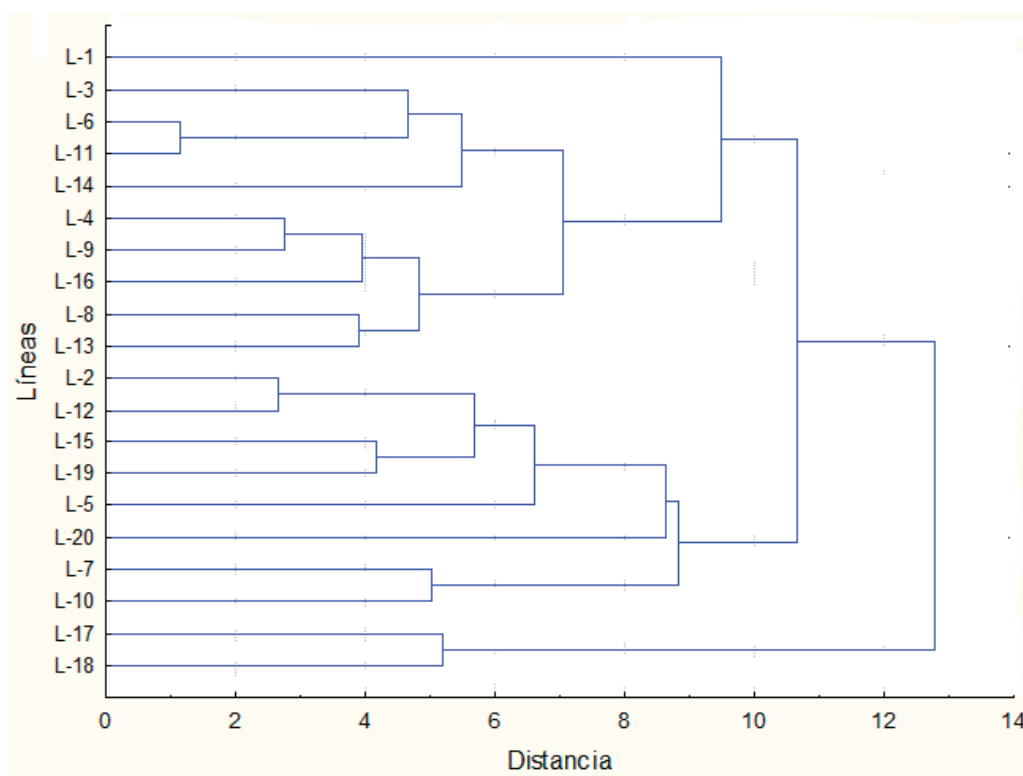


Figura 1. Dendrograma generado en base a los contenidos de parámetros fisicoquímicos de 20 líneas élite de triticales de hábito primaveral, Celaya, Guanajuato, México.

Figure 1. Dendrogram generated based on the contents of physicochemical parameters of 20 elite lines of spring habit triticales, Celaya, Guanajuato, Mexico.

El segundo grupo se formó por el 40 % de las líneas (L-10, L-7, L-20, L-5, L-19, L-15, L-12 y L-2). En este grupo mostró valores inferiores a la media general en PMG, PH y carbohidratos; estos parámetros indican la densidad y/o el grado de llenado del grano principalmente por la morfología del grano característico de las líneas. Normalmente, cuando el grano no está completamente lleno, los valores del peso hectolítrico son bajos, en esta investigación los valores presentados en PH y PMG fueron 5.14 kg hL^{-1} más que se reporta en trigo (70 kg hL^{-1}) lo que refirieron Kandrov *et al.*, (2019). Cabe señalar que el experimento en campo se realizó en diciembre 2017, lo cual favoreció al llenado de grano, sin embargo, obtuvieron mayores promedios en grasa, fibra y proteínas.

El tercer grupo se formó por el 25 % líneas (L-13, L-8, L-16, L-9 y L-4) donde mostraron promedios inferiores a la media general en PMG, PH, grasa, fibra y proteínas. Sin embargo, estos resultados no son significativos para que sean utilizados en la industria molinera dado que superaron en 4.8 kg hL^{-1} al trigo, en relación a cenizas, humedad y carbohidratos se encontraron promedios superiores a la media general. Xiong *et al.* (2022) refieren que la industria molinera produce tres grados de calidad de harina por sus propiedades fisicoquímicas: común o estándar, fina y extrafina, que constituyen la base para la elaboración de panes, tortillas, galletas y pasteles donde las sémolas pueden variar ligeramente en su grado de finura por la calidad de harinas por las líneas que se utilizaron las cuales son de diferente origen genético para ser utilizadas en la elaboración de pastas (espagueti, macarrones, sopas).

Los resultados en esta investigación son indicadores que las líneas en este grupo pueden aprovecharse en la elaboración de galletas, pastas, pasteles y macarrones por el gluten con excepción del contenido de proteínas y carbohidratos que, a pesar de tener bajos valores, aun así, son favorables para considerarlas en la industria panificadora (Zhu, 2018).

El cuarto grupo representó el 25 %, estuvo conformado por L-14, L-11, L-6, L-3 y L-1, donde presentaron promedios inferiores a la media general en PH, grasa, fibra, proteínas y en PMG. En cenizas solo L-14 y L-3 mostraron valores inferiores al 2.0 % aptas para la molienda. Grasa y fibra presentaron valores superiores. Proteínas y carbohidratos obtuvieron ligeramente valores inferiores a lo reportado por Peña *et al.* (2007). Del total de la materia prima alimentaria generada por la industria molinera, aproximadamente 62 % se destina a la panificación; 26 % a galletas, tortillas y otros; y el 12 % a la elaboración de pastas alimenticias. Estas líneas son prometedoras para estar dentro del 12 % para elaborar pasta. Estos resultados coinciden con lo referido por Jing *et al.* (2016) quienes reportaron que el papel de las propiedades funcionales y estructura en harinas de cereales como el trigo y triticales son la base fundamental para tener buena calidad molinera.

La Figura 2 permitió dispersar las 20 líneas en sus propiedades fisicoquímicas con mayor y menor asociación formando tres grupos; el primero contribuyó con el 60 % y se integró por 11 líneas (L-19, L-11, L-6, L-3, L-12, L-2, L-16, L-9, L-8, L-4 y L-13). Estas líneas mostraron mayor asociación con

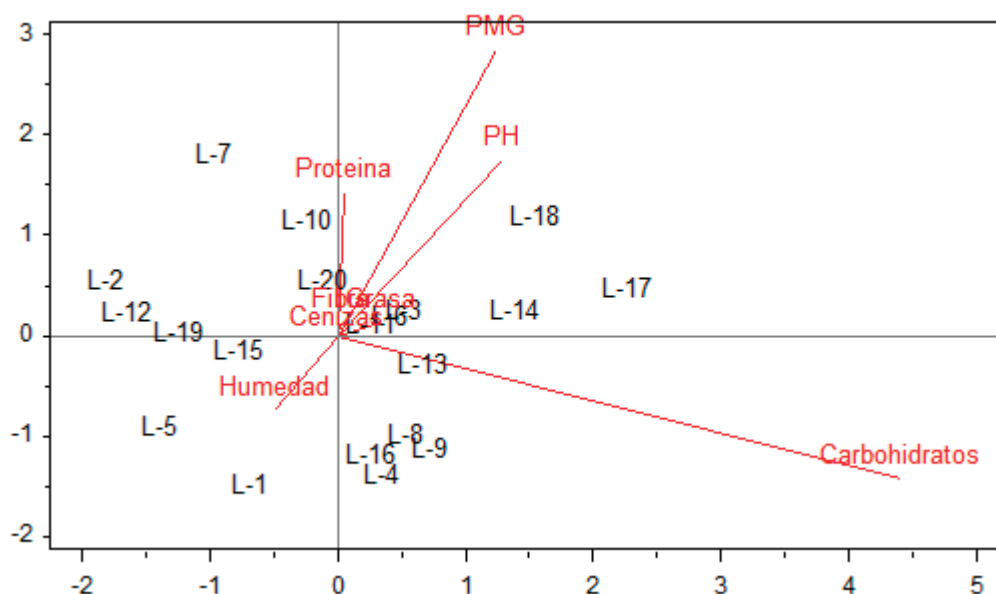


Figura 2. 20 líneas de triticales primaverales con las variables fisicoquímicas, evaluadas en Celaya, Guanajuato.
Figure 2. 20 spring triticale lines with the physicochemical variables, evaluated in Celaya, Guanajuato.

proteínas, grasas y fibra donde L-20, L-2 y L-12 obtuvieron de 1.2 a 1.5 % más en proteínas. En fibra y grasa las 12 líneas obtuvieron en promedio entre 1 y 3 % respectivamente a lo reportado por Xiong *et al.* (2022). Los resultados indicaron que estas líneas en específico tienen buena disponibilidad de nitrógeno en el grano y los niveles de este componente son aceptables para harinas destinadas a la panificación, la producción de tortillas, galletas y pastas. Esto es relevante porque el contenido de gluten es el factor más importante al definir la calidad tanto de cocción de las pastas (espagueti y sopas) como de panificación (Wang *et al.*, 2021). Por lo anterior, los contenidos de estos parámetros pueden ser un factor importante atribuible de las condiciones climáticas en que se colectaron los granos de campo. Los porcentajes de estos parámetros fueron entre 1 a 3 % más que lo reportado por Ferreira *et al.* (2015); quienes refirieron que la calidad de proteína (tipo de gluten) presentes en granos como trigo y triticales son determinantes para el uso potencial en la industria alimentaria. El segundo grupo contribuyó con el 25 % siendo las líneas L-7, L-18, L-17, L-14 y L-10 asociadas a PMG, PH y carbohidratos. Estos parámetros son importantes en el contenido de grano, ya que se define principalmente por su morfología característica de la variedad, esta puede ser alterada negativamente por siembras tardías, deficiencia de nitrógeno, deficiencia en el abasto de agua, y en el llenado de grano por temperaturas altas o bajas. El peso hectolítrico (PH) suele considerarse como un indicador del potencial de rendimiento en harinas que posee una variedad o línea durante la molienda, de tal manera que las variedades con PH bajo (menores a 70 kg hL⁻¹) suelen mostrar bajos rendimientos de harina, por esta razón, durante la investigación se encontraron valores superiores en el PH, el valor más inferior fue en L-7 (76.10 kg hL⁻¹) y el superior en L-17 (78.07 kg hL⁻¹). Estos resultados indican que el PH en este grupo es un factor

decisivo al determinar la calidad en harinas en obtener mejores rendimientos (Jing *et al.*, 2016).

El tercer grupo conformado por L-1, L-5 y L-15 mostraron una relación negativa con el contenido de minerales (cenizas) y humedad en el grano. Este resultado es importante ya que, si la concentración de cenizas y humedad fueran mayor de 2.0 y 14 %, respectivamente sobre todo en granos con bajo PH, puede contaminar de manera significativa la sémola y la harina de la molienda. Los mayores niveles de contaminación con cenizas son particularmente indeseables en granos duros o cristalinos, en virtud de que las partículas oscurecen la semolina y, en mayor grado, las pastas alimenticias, el rango de cenizas en triticales es de 2.0 % para humedad, los contenidos en el grano mayores a 13-14 % favorecen el daño provocando la presencia de microorganismos (Zhu, 2018).

Los niveles de concentración de cenizas en grano que se consideran deseables deben ser menores a 2.0 %. Los resultados indican que este grupo en especial las líneas L-5 y L-15 mostraron valores de cenizas menores a 2.0 %, y humedad. Solo la línea L-15 presentó 12.43 %. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wang *et al.* (2021) quienes evaluaron la calidad de gluten en el grano de variedades en triticales, encontraron que porcentajes por arriba del 14 % en humedad y por encima del 2.1 % en cenizas contribuyen más en la calidad en harinas, por lo tanto, los resultados negativos en esta investigación pueden presentar efectos en tener una calidad de harinas no aptas para la industria alimentaria.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que es posible utilizar el triticale como una alternativa en la industria alimentaria por su calidad nutrimental que contiene el grano, apta para distintos procesos de elaboración en especial de pastas, panes, tortillas, macarrones y sopas, incluidos los procesos

mecanizados en sus harinas ya sea de manera individual o en mezclas con otros cereales como el trigo y avena. Es necesario modernizar la diversidad de variedades de triticales por su calidad proteica que se cultivan en México. Se recomienda seguir utilizando en futuras investigaciones las líneas L-18, L-17 y L-20 por haber obtenido promedios superiores en las variables de estudio favoreciendo los rangos de calidad industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta investigación agradecen al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo por haber proporcionado el material genético.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

REFERENCIAS

- Aisawi, K., Reynolds, M., Singh, R., Foulkes, M. 2015. The physiological basis of the genetic progress in yield potential of CIMMYT spring wheat cultivars from 1966 to 2009. *Crop Sci.* 55(4): 1749-1764.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Ammar, K., Mergoum, M., and Gomez, M.H. 2004. The history and evolution of triticale, the triticale improvement and production. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Biel, W., Kazimierska, H., and Bashutska, U. 2020. Nutritional value of wheat, triticale, barley and oat grains. *Acta Sci. Pol. Zootechnica* 19 (2), 19–28.
- Comisión Nacional del Agua 2018. Normales climatológicas por estado. Servicio Meteorológico Nacional. Consultado 28 de mayo de 2018. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx>.
- Chavoushi, M., Arzani, A., Kadivar, M., and Sabzalian, M.R. 2020. Evaluation of alveograph parameters and gluten proteins of triticale by using solvent retention capacity method (II). *Innovative Food Technologies*, vol. 7 (2), 163-187.
- Ferreira, V., Grassi, E., Ferreira, A., Santo, H., Castillo, E., Paccapelo, H. 2015. Triticales y tricipiros: interacción genotipo-ambiente y estabilidad del rendimiento de grano. *Chilean J. Agric. Anim. Sci.* 31(2):93-104.
- Fraś, A., Gołębiewska, K., Gołębiewski, D., Mańkowski, D., Boros, D., and Szczówka, P. 2016. Variability in the chemical composition of triticale grain, flour and bread. *Journal of Cereal Science*. Volume 71, 66-72, p.
- Giunta, F., Motzo, R., Virdis, A., Cabiglieri, A. 2017. The effects of forage removal on biomass and grain yield of intermediate and spring triticales. *Field Crops Research* 200: 47-57.
- Gulmezoglu, N., Alpu, O., and Ozer, E. 2010. Comparative performance of triticale and wheat grains by using path analysis. *BJAS*, 16: 443-453.
- Jing, J.W., Guang, L., Yan, B., Huang, Q., Zeng, H., Guo, S.S., Yi, H., Lin, Li., Song, Q.S. 2016. Role of N-terminal domain of HMW 1Dx5 in the functional and structural properties of wheat dough. *Food Chemistry*. 213: 682-690.
- Krasilnikov, V.N., Batalova, G.A., Popov, V.S., Sergeyeva, S.S. 2018. Fatty Acid Composition of Lipids in Naked Oat Grain of Domestic Varieties. *Russ. Agric. Sci.*, 44 (5), 406–408.
- Kandrokov, R.K. 2019. Technological properties of wheat-triticale flour. *Vestn. Yuzhno-Ural. Gos. Univ., Ser.: Pishch. Biotekhnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 13–22.
- Kandrokov, R.K., Yudina, T.A., Ruban, N.V. 2021. The Effect of the Wheat and Triticale Grain Mixture Ratio on Technological Properties of Wheat Triticale Flour. *Russ. Agricult. Sci.* 47, 177–181.
- Montemayor, T.J.A., Segura, C.T.M., Munguia, L.J., y Woo, R.J.L. 2015. Productividad del agua en el cultivo de triticale (X. *Triticosecale* Wittmack) en La Comarca Lagunera de Coahuila, México. *Rev. Mex. de Ciencias Agrícolas* Vol.6 Núm.7 28 de septiembre a 11 de noviembre. 1533-1541, p.
- Noriega-Carmona, M.A., Cervantes-Ortiz, F., Solís-Moya, E., Andrio-Enríquez, E., Rangel-Lucio, J.A., Rodríguez-Pérez, G., García-Rodríguez, J.G. 2019. Efecto de la fecha de siembra sobre la calidad de semilla de trigo en el Bajío, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:375-384.
- Núñez, C.A.C., Escobedo, L.D. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Revista Agronomía Mesoamericana*. Vol. 22 (2): 415-427.
- Oliete, B., Pérez, G., Gómez, M., Ribotta, P., Moiraghi, M., and León, A. 2010. Use of wheat, triticale and rye flours in layer cake production. *J. Food Sci. and Tech.* 45(4):697- 706.
- Peña, B.R.J., Hernández, E.N., Pérez, H.P., Villaseñor, H.E.M., Gómez, V.M., Mendoza, L.A. 2007. Calidad de la cosecha de trigo en México; ciclo otoño-invierno 2006-2007. *Publicación Especial del CONASIST-CONATRIGO*. 24 p.
- Pattison, L.A., Appelbee, M., and Trethoman, R.M. 2014. Characteristics of modern triticale quality: Glutenin and scalin subunit composition in a mixiograph properties. *J. Agric. Food. Chem* 62 (21), 4924-4931.
- Pomortsev, A.V., Dorofeev, V.N., Zorina, S.Y., Katysheva, B.N., Sokolova, G.L. 2019. The effect of planting date on Winter rye and triticale overwinter survival and yield in Eastern Siberia. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 315 042031. *AGRITECH*. 5 pp.
- Pruska, K.A., Makowska, A., and Kedzior, Z. 2017. Rheological characterization of gluten from triticale (X. *Triticosecale* Wittmack). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 97 (14): 5043-5052.
- Riasat, M., Kiaani, S., Saed, M.A., and Mohamed, P. 2019. Oxidant related biochemical traits are significant indices in triticale grain yield under drought stress condition. *Journal of Plant Nutrition* 42(2): 111-126.
- Wang, K., Wang, Y., Liu, Z., and Ni, Y. 2021. Effects of extraction methods on the structural characteristics and functional properties of dietary fiber extracted from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Hydrocolloids*, vol. 110. 106162.
- Wu, D.T., Liu, W., Han, Q.H., Du, G., Li, H.Y., Yuan, Q., and Qin, W. 2019. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of non-starch polysaccharides from different kiwifruits. *International journal of biological macromolecules*, 136, 891-900.
- Xiong, M., Zheng, S., Bai, T., Chen, D., Qin, W., Zhang, Q., Lin, D., Yuntao, L., Liu, A., Huang, Z. and Chen, H. 2022. The difference among structure, physicochemical and functional properties of dietary fiber extracted from triticale and hull-less barley. *Food Science Technology*, vol. 154. 112771 p.
- Zhu, F. 2018. Triticale: Nutritional composition and food uses. *Food Chemistry*, February, 15, 241: 468-479.

Cascarilla de arroz fragmentada como componente del medio de crecimiento de plántulas de albahaca

Fragmented rice hulls as a component of the growth medium of basil seedlings

E. Cruz-Crespo^{1*}, A. Can-Chulim¹, W. Chan-Cupul², G. Luna-Esquivel¹, A.N. Rojas-Velázquez³, O.R. Macilla-Villa⁴

¹ Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México.

² Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.

³ Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.

⁴ Departamento de Producción Agrícola, Universidad de Guadalajara, Autlán, Jalisco, México.

RESUMEN

Los sustratos, por sus propiedades, pueden diferenciar el crecimiento de plántulas, aunque esto puede variar según la época del año. El objetivo fue evaluar la cascarilla de arroz fragmentada, sola y en mezcla con peat moss (PM) o vermiculita (V) sobre el crecimiento de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en otoño y en primavera. La hipótesis fue que el crecimiento de plántulas incrementará por el aumento de la cascarilla de arroz, en relación con el peat moss o la vermiculita, y el crecimiento contrastará entre otoño y primavera. El diseño experimental fue factorial 9x2, con 20 repeticiones; se realizó ANDEVA y comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$). Las variables fueron: altura, diámetro de tallo, área foliar, biomasa fresca y seca de la parte aérea, biomasa fresca y seca de raíz, longitud y volumen de raíz. Se encontraron interacciones del sustrato por ciclo de producción donde el sustrato CF y CF+PM-25:75 fueron los más adecuados en otoño, y en primavera fue CF+PM-50:50, por presentar los valores más altos en la mayoría de las variables. **Palabras clave:** *Ocimum basilicum*, propiedades físicas, temperatura del sustrato.

ABSTRACT

Substrates, due to their properties, can differentiate seedlings growth, although this can vary according to the time of the year. The objective was to evaluate the effect of the fragmented rice husk (FH), alone and in a mixture with peat moss (PM) or vermiculite (V), on the growth of basil seedlings (*Ocimum basilicum* L.) in the autumn and spring seasons. The hypothesis was that seedling growth will increase due to the increase of the rice husk in relation to PM or V, and that the growth will contrast in autumn and in spring. The experimental design was factorial 9x2, with 20 repetitions; the analysis of variance and comparison of means were carried out (Tukey $p \leq 0.05$). The variables were as follows: height; stem diameter; leafy area; dry and fresh biomass of the aerial part; dry and fresh root biomass, and root length and volume. Interactions of the substrate and the production cycle were found, in which the FH and FH+PM-25:75 substrates were most adequate in autumn, and FH+PM-50:50 in spring, in terms of presenting the highest values of the majority of the variables.

Key words: *Ocimum basilicum*, physical properties, temperature substrate.

INTRODUCCIÓN

El peat moss es el sustrato principal para la producción de plántulas en contenedor, y se produce en su mayor parte en los Países Bajos; sin embargo, por su explotación a escala desde 1950 sus reservas disminuyeron porque no es renovable; esto se relaciona con la destrucción de ecosistemas frágiles y el incremento de emisiones de carbono (Gerding *et al.*, 2015), y por consecuencia su costo es alto y su uso se limita. Ante esto, se buscan sustratos renovables alternativos y de costo accesible para sustituir al peat moss (Luna-Fletes *et al.*, 2021). Entre estos están los sustratos inorgánicos perlita y vermiculita (Haygert-Lencina *et al.*, 2017) y los sustratos orgánicos como compostas y cascarilla de arroz (Castoldi *et al.*, 2014; Guerrero-Guerrero, 2021). La cascarilla de arroz en el cultivo de plantas se ha estudiado carbonizada (aunque la carbonización genera contaminación por lo que existe controversia por su uso), expandida, y cruda entera o fragmentada (Quintero *et al.*, 2013).

Existen algunos estudios de la cascarilla de arroz cruda fragmentada en mezcla con peat moss en la producción de plántula de algunas especies, más los resultados son controversiales. Zanin *et al.* (2011) refirieron que el incremento de la cascarilla de arroz cruda fragmentada hasta en 50 % en mezcla con peat moss disminuyó la altura, la biomasa fresca de la parte aérea y el número de hojas de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. y *Capsicum annum* L., pero en *Cichorium intybus* 'Leonardo' estas variables permanecieron sin cambio cuando la cascarilla de arroz aumentó hasta 75 %, y en *Cichorium intybus* 'N 01' las mismas variables incrementaron de valor; los autores infirieron que las propiedades físicas de los sustratos pudieron ser en parte las responsables de la respuesta del crecimiento, pero estas no se evaluaron. Bassan *et al.* (2014) observaron que el crecimiento de plántulas de tomate disminuyó cuando la cascarilla de arroz cruda fragmentada incrementó en 33, 67 o 100 % en la mezcla con peat moss. Sobre el uso de la vermiculita en mezcla con cascarilla de arroz solo se tienen algunos antecedentes con cascarilla de arroz entera, pero no con cascarilla de arroz fragmentada.

*Autor para correspondencia: Elia Cruz Crespo
 Correo electrónico: ccruz2006@yahoo.com.mx

Recibido: 11 de abril de 2022

Aceptado: 29 de enero de 2023

da. De acuerdo a lo antes expuesto es necesario ampliar la investigación sobre el uso de la cascarilla de arroz cruda fragmentada para alguna especie en particular, sin dejar de lado las propiedades físicas. Por otra parte, la temperatura del sustrato puede ser relevante en el crecimiento de las plantas, y aún más en las épocas del año con alta temperatura donde la cascarilla de arroz podría jugar un papel importante dada su baja conductividad térmica, propiedad que reportó Vargas *et al.* (2013).

La albahaca se produce en México para exportación, y Nayarit figura entre los estados productores (Moncayo *et al.*, 2015). Para la producción en campo de esta se utiliza plántula proveniente de charolas, donde se utilizan sustratos comerciales a base de peat moss (Sunshine®). Existen reportes de sustratos orgánicos como vermicompost, compost, estiércol solarizado para la producción de albahaca, más en Nayarit se cuenta con cascarilla de arroz, la cual es una opción para la producción de plantas. La hipótesis fue que las variables del crecimiento de plántulas de albahaca incrementarán por el aumento de la cascarilla de arroz cruda fragmentada, hasta cierta proporción, en relación con el peat moss o a la vermiculita, y el crecimiento contrastará entre otoño y primavera. El objetivo fue evaluar la cascarilla de arroz cruda fragmentada, sola y en combinación con peat moss o vermiculita (25:75, 50:50, 75:25 v/v) sobre el crecimiento de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en otoño y en primavera, y a partir de esto obtener los sustratos más adecuados para cada ciclo de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un invernadero con cubierta de plástico y paredes de malla anti-áfidos, con 3 m de altura a la canaleta, y 5 m de altura a la línea cumbre, se realizó el experimento, en dos ciclos: 1) otoño, del 1 al 30 de octubre de 2017, con intensidad de luz de 390 y 375 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 34 y 16 °C, y HR de 85 y 40 %, máxima y mínima, respectivamente; 2) primavera, del 1 al 30 de mayo de 2018, con intensidad de luz de 475 y 465 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 38 y 19 °C, y HR de 78 y 36 %, máxima y mínima respectivamente.

Los sustratos (tratamientos) fueron: peat moss (Premier®), vermiculita Alux® de 2 mm, cascarilla de arroz de la planta arrocera "La Villita" de 0.2 a 3 mm, y mezclas de estos sustratos en proporciones volumétricas diferentes. La cascarilla de arroz se desinfectó con agua de la llave a 80 °C, después se fragmentó en un molino Jersa TL3000 (México) con criba de 3 mm de diámetro. En todos los sustratos se determinaron las propiedades físicas de acuerdo con Pire y Pereira (2003) (Tabla 1).

En la cascarilla de arroz cruda fragmentada, peat moss y vermiculita se obtuvo el extracto de saturación (2:1) y en este se determinó N, P, K, Ca y Mg conforme con APHA (2012) (Tabla 2). Cada sustrato se colocó en charolas germinadoras de unicele de 200 cavidades, después se sembró *O. basilicum* cultivar Thai, una semilla por cavidad. Cada tercer día, a las 12:00 h, se registró la temperatura de los sustratos con un termómetro de varilla Hanna HI 145 (Italia) a 3 cm de profundidad (Figura 1).

Tabla 1. Propiedades físicas de la cascarilla de arroz cruda fragmentada, peat moss, vermiculita y sus mezclas.
Table 1. Physical properties of the fragmented raw rice Husk (FH), peat moss (PM), vermiculite (V), and their mixtures.

Sustratos	Composición (% v/v)	Clave	PT (%)	CA (%)	CaRA (%)	DA (g cm ⁻³)
CF	100	CF	75.13	26.43	48.70	0.28
PM	100	P	84.90	7.87	77.02	0.15
V	100	V	76.75	13.56	63.20	0.17
CF+PM	25:75	CF+P-25:75	82.31	14.16	68.15	0.19
CF+PM	50:50	CF+P-50:50	80.12	20.40	59.72	0.23
CF+PM	75:25	CF+P-75:25	75.70	20.70	55.00	0.26
CF+V	25:75	CF+V-25:75	81.03	21.87	59.17	0.20
CF+V	50:50	CF+V-50:50	80.93	24.83	56.10	0.23
CF+V	75:25	CF+V-75:25	78.50	28.00	50.51	0.25
C.V.	-	-	12.00	8.00	7.55	5.34

PT: porosidad total; CA: capacidad con aire; CaRA: capacidad de retención de agua; DA: densidad aparente; CF: cascarilla de arroz cruda fragmentada; PM: peat moss; V: vermiculita.

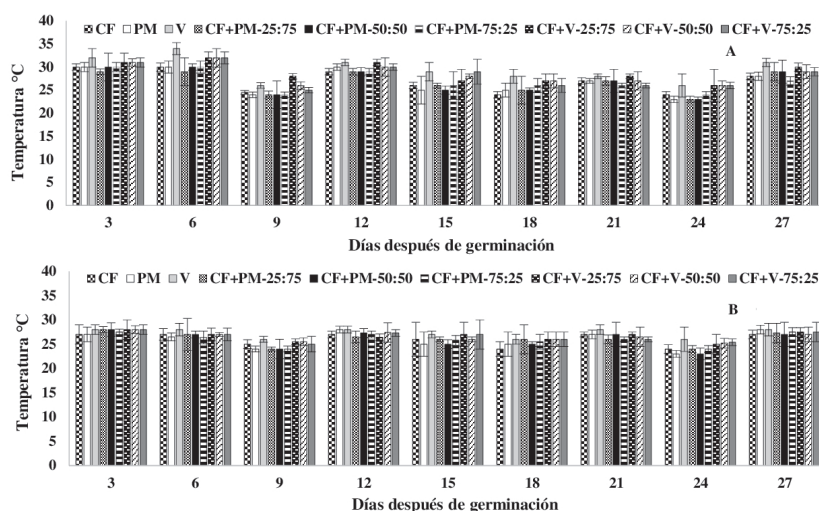


Figura 1. Temperatura de los sustratos cascarilla de arroz cruda fragmentada (CF), peat moss (PM), vermiculita (V) y de las mezclas CF+PM, y CF+V durante primavera 2018 (A) y otoño 2017 (B).

Figure 1. Temperature of the fragmented raw rice Husk substrates (FH), peat moss (PM), vermiculite (V), and of the FH+PM, and FH+V mixtures during spring 2018 (A) and autumn 2017 (B).

Tabla 2. Contenido nutrimental en el extracto de saturación de la cascarilla de arroz cruda fragmentada, peat moss y vermiculita.

Table 2. Nutritional content in the fragmented raw rice Husk saturation extract, peat moss, and vermiculite.

Sustrato	N	P	K	Ca	Mg
			mg kg ⁻¹		
CF	13	782	2195	86	939
PM	18	130	128	76	252
V	-	30	16	90	19
C.V	5.00	4.50	7.16	8.13	6.70

CF: cascarilla de arroz cruda fragmentada; PM: peat moss; V: vermiculita.

Los riegos se suministraron diario con solución nutritiva, un riego las primeras dos semanas y dos riegos las dos semanas siguientes; el gasto fue de 550 mL por riego. La solución nutritiva fue la de Steiner (1984) al 25 %, pH 5.5 y conductividad eléctrica de 0.56 dS m⁻¹. En el cálculo del requerimiento de los macroelementos se consideró el análisis de agua, y éstos se suministraron con los fertilizantes Ca(NO₃)₂·4H₂O Yara Liva®, MgSO₄·7H₂O Sulmag®, KNO₃ Ultrasol®, K₂SO₄ Vitagrow®, KH₂PO₄ Peñoles® y HNO₃ J. T. Baker®.

Los microelementos se suministraron en el riego con el producto comercial Ultrasolmicro Rexene Mix®. El control preventivo de enfermedades se realizó con el fungicida Captan 500® (1 g L⁻¹). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 9 x 2, con 20 repeticiones. La unidad experimental consistió de 10 plántulas.

Las variables evaluadas fueron: 1) altura de plántula, se midió de la base del tallo a la yema apical, con cinta métrica; 2) diámetro de tallo, se midió 1.5 cm arriba del nivel del sustrato, con vernier digital Trupper® mod.CALDI-6MP (México); 3) área foliar, las hojas se pasaron por un integrador de área foliar LI-3100C (Estados Unidos); 4) biomasa fresca y seca de la parte aérea, las plántulas se cortaron a nivel de sustrato y se pesaron en una balanza analítica A&D mod. GR200 (0.0001

g) (Japón), después se colocaron en bolsas de papel y se secaron a 60 °C en una estufa con circulación de aire Blue M® mod. SW-17TA (Estados Unidos) hasta peso constante que se midió con la balanza analítica; 5) biomasa fresca y seca de raíz, la raíz libre de partículas de sustrato se pesó y se secó como se describe en el inciso 4); 6) volumen de raíz, en una probeta graduada con agua la raíz se sumergió y se midió el volumen desplazado; 7) longitud de raíz, se midió con cinta métrica. Las variables se obtuvieron a los 30 días después de germinación. Con los datos se realizó un análisis de varianza y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) en el paquete estadístico SAS versión 9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró que los factores principales tuvieron efecto sobre las variables diámetro de tallo (DT), biomasa fresca de raíz (BFR) y longitud de raíz (LR) (Cuadro 3); en tanto que la interacción sustrato por ciclo de producción mostró efecto sobre la altura de plántula (AP), el área foliar (AF), la biomasa fresca y seca de la parte aérea (BFA, BSA), la biomasa seca de la raíz (BSR) y el volumen de raíz (VR).

Efecto de los factores principales

La comparación de medias para el factor sustrato indicó que el mayor DT se presentó en CF y en CF+PM-25:75, en segundo término, quedaron CF+V-50:50 y CF+V-75:25 y después PM, CF+PM-50:50 y CF+PM-75:25, CF+V-52:75 y V; por el ciclo de producción, el DT fue mayor en otoño (Cuadro 4). La BFR con el valor más alto se obtuvo con CF+PM-50:50 y CF+PM-75:25, en segundo lugar, se ubicaron CF, PM, CF+PM-25:75, CF+V-50:50 y CF+V-75:25, por último, CF+V-25:75 y V; la BFR fue mayor en primavera. La LR obtuvo su valor más bajo solo en el sustrato V, los demás sustratos fueron iguales entre sí; también la LR fue mayor en el otoño en comparación con la

Cuadro 3. Análisis de varianza para las variables de crecimiento de la parte aérea y raíz de albahaca Thai, a los 30 días después de la germinación.

Table 3. Analysis of variance for growth variables of the Thai basil aerial part and root, at day 30 post-germination.

Factor	AP	DT	AF	BFA	BSA	BFR	BSR	LR	VR
S	< 0.008	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001
Ci	< 0.006	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.0001	< 0.005	< 0.001
S X Ci	< 0.0001	ns	< 0.0001	< 0.0002	< 0.0002	ns	< 0.0001	ns	< 0.001

ns: diferencias no significativas; AP: altura de planta; DT: diámetro de tallo; AF: área foliar; BFA: biomasa fresca de la parte aérea; BSA: biomasa seca de la parte aérea; BFR: biomasa fresca de raíz; BSR: biomasa seca de raíz; LR: longitud de raíz; VR: volumen de raíz; S: sustrato; Ci: ciclo de producción.

primavera. Estos resultados no guardan similitud con otros estudios, Kratz *et al.* (2017) reportaron incremento lineal del diámetro de tallo, de la biomasa seca de la parte aérea y de la raíz, y de la altura de plántulas de *Eucalyptus benthamii* cuando el peat moss aumentó de 10 al 90 % en la mezcla con cascarilla de arroz entera carbonizada; Auler *et al.* (2015) evidenciaron que en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) las variables de la parte aérea y de la raíz aumentaron con el incremento de vermiculita en 25 y 50 % en mezcla con peat moss, en comparación a solo peat moss.

En esta investigación los valores de las variables no siguieron una tendencia de incremento de acuerdo con el aumento de la proporción de un sustrato de 0 a 100 %; en el caso del DT los valores fueron iguales en los sustratos CF y CF+PM-25:75, y la BFR fue igual entre CF+PM-50:50 y CF+PM-75:25.

Por otra parte, Garbanzo y Vargas (2014) indicaron que en peat moss la longitud de raíz de plántulas de tomate fue mayor en comparación con compost/bocashi/cascarilla

de arroz entera, y en compost/bocashi/fibra de coco, argumentando que esto se debió a la densidad aparente más baja del peat moss. En la presente investigación en el sustrato V se obtuvo la menor LR, aunque la densidad aparente de este sustrato fue baja y de valor similar al PM (Tabla 1).

Efecto de la interacción sustrato por ciclo de producción

La interacción entre factores indicó que la AP fue de valor mayor en el otoño en todos los sustratos. En referencia con los sustratos CF+V, en otoño CF+V-50:50 obtuvo el valor más alto en la AP en comparación con CF+V-25:75 y CF+V-75:25, pero en primavera CF+V-75:25 obtuvo la AP mayor en relación con CF+V-25:75. En los sustratos CF+PM, en primavera la AP fue igual en las tres proporciones, pero en otoño CF+PM-25:75 obtuvo la AP mayor en relación con CF+PM-50:50 y CF+PM-75:25 (Figura 2 A).

El AF fue mayor en otoño en todos los sustratos, a excepción de CF+PM-75:25 y CF+V-75:25 en los cuales el AF fue igual en ambos ciclos de producción (Figura 2 B). En los

Tabla 4. Comparación de medias de diámetro de tallo, biomasa fresca de raíz y longitud de raíz de albahaca Thai por efecto de los factores principales sustrato y el ciclo de producción, a los 30 d después de la germinación.

Table 4. Comparison of averages for stem diameter, fresh root biomass, and root length of length of Thai basil affected affected by the main substrate and production-cycle factors, at day 30 post-germination.

Factor	DT (mm)	BFR (g)	LR (cm)	Factor	DT (mm)	BFR (g)	LR (cm)
Sustrato (S)				Ciclo prod (Ci)			
CF	3.01 a	23.91 b	7.23 a	Otoño	3.06 a	18.34 b	7.39 a
PM	2.73 c	23.83 b	7.25 a	Primavera	2.38 b	27.77 a	6.66 b
V	2.13 e	12.08 d	5.49 b				
CF+PM-25:75	2.91 ab	23.12 bc	7.38 a				
CF+PM-50:50	2.74 c	29.49 a	7.12 a				
CF+PM-75:25	2.72 c	27.30 a	7.28 a				
CF+V-25:75	2.52 d	21.20 c	7.03 a				
CF+V-50:50	2.81 bc	23.10 bc	7.28 a				
CF+V-75:25	2.81 bc	23.44 bc	7.23 a				
DSH	0.1588	2.23	0.76	DSH	0.046	0.673	0.2208
C.V.	3.00	9.79	5.69				

Medias con letra diferente en cada columna indican diferencia estadística (Tukey; $p \leq 0.05$); DSH: diferencia significativa honesta; DT: diámetro de tallo, BFR: biomasa fresca de raíz; LR: longitud de raíz; CF: cascarilla de arroz cruda fragmentada; V: vermiculita; PM: peat moss.

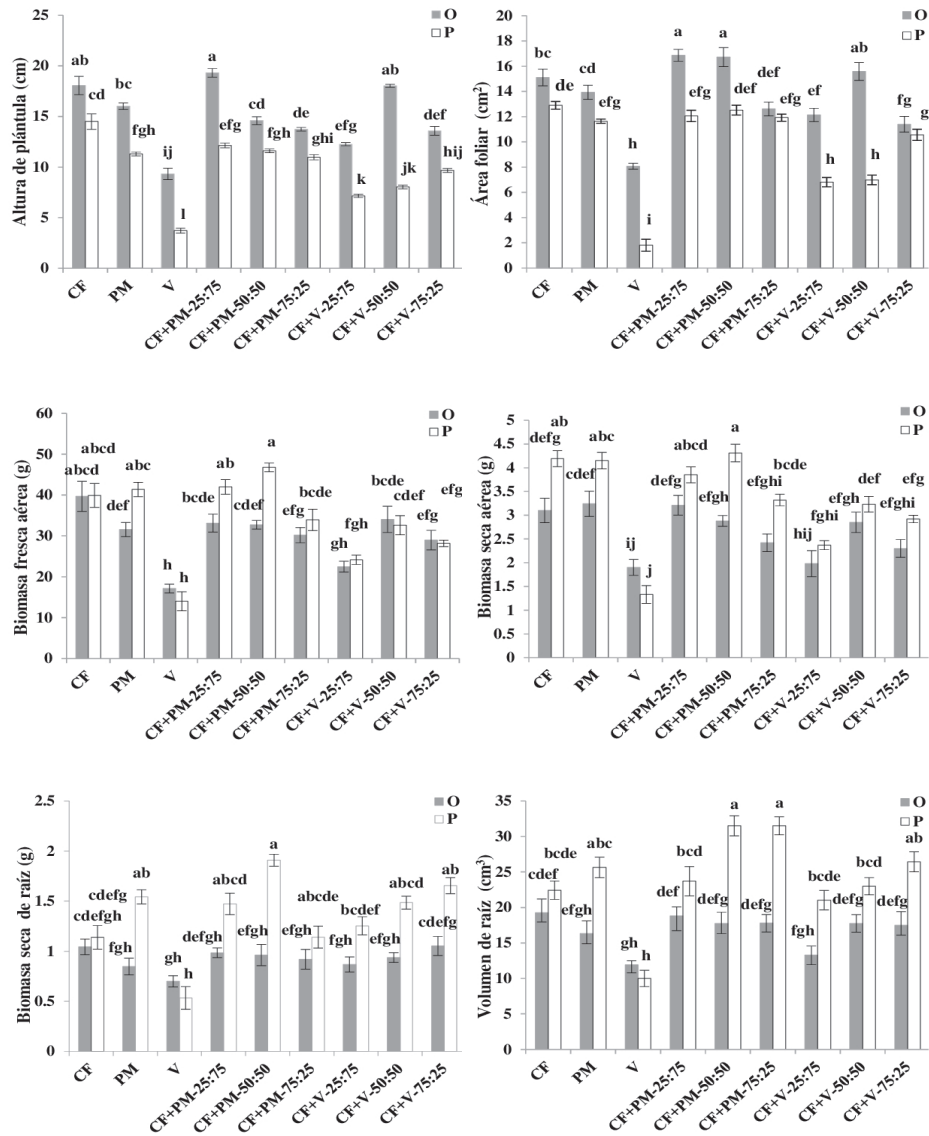


Figura 2. Interacción sustrato x ciclo de producción para altura de plántula. (A), área foliar (B), biomasa fresca aérea (C), biomasa seca aérea (D), biomasa seca de raíz (E) y volumen de raíz (F) de albahaca Thai, a los 30 d después de la germinación. CF: cascarilla de arroz cruda fragmentada; PM: peat moss; V: vermiculita; O: otoño, P: primavera.

Figure 2. Substrate production-cycle interaction in terms of seedling height. (A), leafy area (B), fresh aerial biomass (C), dry aerial biomass (D), dry root biomass (E), and volume (F) of the Thai basil, at 30 days post-germination. FH: fragmented raw rice Husk; PM: peat moss; V: vermiculite; O: autumn; P: spring.

sustratos CF+V, en otoño el AF fue mayor en CF+V-50:50 en comparación con las proporciones 25:75 y 75:25; en primavera el AF fue mayor en CF+V-75:25 comparado con las otras dos proporciones.

En los sustratos CF+PM, en otoño CF+PM-25:75 y CF+PM-50:50 obtuvieron la AP mayor en comparación con CF+P-75:25; en primavera el AF se mantuvo sin diferencia entre las tres proporciones (Figura 2 B).

La BFA de las plántulas fue igual en los dos ciclos de producción en todos los sustratos, a excepción de CF+PM-50:50 y PM, en los cuales la BFA fue mayor en la primavera (Figura 2 C). En los sustratos CF+PM, en primavera la BFA fue menor en

CF+PM:75:25, en el otoño no se observó diferencia entre las tres proporciones. En los sustratos CF+V, en primavera la BFA fue igual entre las tres proporciones, pero en otoño CF+V-50:50 obtuvo el valor mayor (Figura 2 C).

La BSA de las plántulas en todos los sustratos fue igual en otoño y en primavera, a excepción de CF y CF+PM:50:50 en donde la BSA fue mayor en primavera (Figura 2 D). En los sustratos CF+V, la BSA fue igual entre las tres proporciones en primavera y en otoño; en los sustratos CF+PM, en otoño la BSA fue igual en las tres proporciones, en primavera en el sustrato CF+PM-75:25 la BSA fue menor en referencia con CF+PM-50:50 (Figura 2 D).

La BSR en los sustratos CF, CF+PM-25:75, CF+PM-75:25, CF+V-25:75 y V fue igual en los dos ciclos de producción, en cambio en los sustratos PM, CF+PM-50:50, CF+V-50:50 y CF+V-75:25 se obtuvieron valores más altos en la primavera (Figura 2 E). En los sustratos CF+PM la BSR no fue diferente entre las tres proporciones, en primavera ni en otoño; en los sustratos CF+V, en otoño la BSR fue igual en las tres proporciones, en cambio en primavera la BSR fue más baja en CF+V-25:75 en relación con las proporciones 50:50 y 75:25 (Figura 2 E).

En el VR los sustratos CF, CF+PM-25:75, CF+V-50:50 y V mantuvieron valor similar en los dos ciclos de producción, en cambio en primavera el sustrato PM, CF+PM-50:50, CF+PM-75:25, CF+V-75:25 y CF+V-25:75 el VR fue mayor (Figura 2 F). En los sustratos CF+PM, en primavera el VR fue menor en el sustrato CF+PM-25:75 en comparación con las proporciones 50:50 y 75:25; en otoño el VR fue igual en las tres proporciones. En los sustratos CF+V, el VR fue igual entre las tres proporciones en ambos ciclos de producción (Figura 2 F).

En los resultados se esperaba que los sustratos CF+PM:25:75, CF+PM-50:50, CF+V-25:75 y CF+V-50:50 se presentaran los valores más altos de las variables de crecimiento, tanto en otoño como en primavera, esto por ser los sustratos con las propiedades físicas que más se aproximaron a los valores óptimos (Cuadro 1) según Ansorena (1994) (CA 10-30 % y CaRA 55-70 %). Sin embargo, los resultados por el efecto de los factores principales y de la interacción de estos, mostraron que en otoño los sustratos que se ubicaron en los primeros tres lugares por el valor más alto para cada una de las variables fueron CF+PM-25:75 (AP, DT, AF, BFA, BSA, BFR, VR), CF (AP, DT, BFA, BSA, BFR, BSR, VR), CF+V-50:50 (AP, AF, BFA, DT) y CF+PM-50:50 (AF, BFR, VR) (Figura 2; Cuadro 4), lo que evidenció que los sustratos CF+PM-25:75 y CF favorecieron el mayor número de variables del crecimiento de albahaca. Esto se explica en parte, a las propiedades físicas (Cuadro 1), ya que en el sustrato CF, la CA fue alta y la CaRA fue la más baja, en comparación con los demás, lo que pudo favorecer el crecimiento de raíces y lograr con ello la absorción de agua y nutrientes suficientes, puesto que el VR y la BSR no fueron menores en comparación con CF+PM-50:50 y CF+V-50:50 (Figura 2 E y F). El Sharkawi *et al.* (2014) indican que la proporción entre la CA y la CaRA determina la eficiencia del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en la raíz en sustrato, lo que afecta la absorción de agua y nutrientes. Por otra parte, la concentración de oxígeno baja disminuye la producción de ATP y afecta el metabolismo de carbohidratos en la planta y también se altera la morfología de la raíz y la fotosíntesis con efecto negativo en el crecimiento general de la planta (Moreno *et al.*, 2020). En este trabajo el sustrato PM fue el que presentó la CA más baja, y en otoño este no favoreció el crecimiento de las plántulas. En plantas de fresa (*Fragaria* sp.) cultivadas en suelo, el cual se acondicionó para su uso como sustrato, se encontró que el crecimiento de las raíces (biomasa seca de raíz) fue mayor cuando la CA fue mayor (entre 13 % y 25 %) (González *et al.*, 2016). No obstante, en este trabajo,

en los sustratos CF y CF+PM-25:75 no se descartó que el agua fácilmente disponible (AFD), componente de la CaRA, pudo contar con un valor tal que favoreció el crecimiento de las plántulas durante el otoño; en tanto, en los sustratos V y CF+V (25:75, 50:50, 75:25), donde no se favoreció la mayor parte de las variables del crecimiento, el AFD pudo contar con un valor bajo. Esto se sustenta mediante Sambo *et al.* (2008) quienes encontraron que la cascarilla de arroz cruda fragmentada, en diferentes tamaños de partícula, la porosidad total y la capacidad de retención de agua obtuvieron valor menor en comparación con peat; sin embargo, el AFD fue mayor en la cascarilla de arroz en todos los tamaños de partícula. Esto coincide para la cascarilla de arroz cruda fragmentada y peat moss de este trabajo, a excepción del AFD, la cual no fue evaluada (Cuadro 1). También, en los sustratos en mezcla en proporciones crecientes, pueden tener porosidad total y capacidad de retención de agua de valor igual, pero el AFD puede ser diferente o igual, dependiendo de los sustratos en la mezcla, tal como señala Cruz-Crespo *et al.* (2019) quienes encontraron que los sustratos lombricomposta + cascarilla de arroz cruda entera (L+C), lombricomposta + piedra pómez (L+PP) y lombricomposta + tezontle (L+T), en 80:20, 65:35, 20:80 v/v, obtuvieron porosidad total y CaRA similar entre las diferentes proporciones, más el AFD en L+C fue mayor, en L+PP fue igual y en L+T fue menor cuando incrementó la proporción de lombricomposta. Esto pudo haber sucedido entre las mezclas de sustratos de este trabajo (Cuadro 1).

Otros factores que se consideraron fueron el aporte nutrimental (Cuadro 2) y la temperatura de los sustratos (Figura 1). En el extracto de saturación de CF se encontraron en mayor cantidad los nutrimentos N, P, K, Ca y Mg en relación con los sustratos PM y V, a excepción del N, por lo que no se descartó su contribución en el crecimiento de las plántulas en especial en el sustrato CF, ya que estos son elementos nutritivos esenciales para el crecimiento de las plantas. En referencia a la temperatura de los sustratos en otoño, los sustratos CF, PM y CF+PM (25:75, 50:50 y 75:25 v/v) presentaron 26, 25.9, 26, 25.8 y 25.9 °C, respectivamente; en tanto que, para V y CF+V (25:75, 50:50, 75:25 v/v) fue de 27.2, 26.8, 26.4 y 26.4 °C, respectivamente (Figura 1). En estos últimos la temperatura fue mayor, lo que puede explicar en parte el valor menor de las diferentes variables del crecimiento en estos sustratos. Van y Dove (2014) mencionan que el aumento de la temperatura en el sustrato disminuye la solubilidad del oxígeno en la solución y a la vez aumenta la demanda de oxígeno por la raíz de la planta.

En primavera, los resultados mostraron que los sustratos que se ubicaron en los primeros tres lugares por el valor más alto en cada variable fueron CF+PM-50:50 (AP, AF, BFA, BSA, BFR, BSR y VR), seguido de CF (AP, DT, AF, BSA y BFR), PM (AF, BFA, BSA y BSR) y CF+PM-25:75 (AP, BFA, DT) (Figura 2; Cuadro 4).

De acuerdo a lo que señalaron Van y Dove (2014) sobre la relación de la temperatura y el nivel de oxígeno en sustratos, se dedujo que debido la capacidad de aire más alta (CA) del sustrato CF+PM-50:50 este desplazó a CF+PM-25:75

en primavera (el cual se ubicó en primer lugar en otoño), lo que favoreció el incremento del VR y BSR en relación con el otoño y a la vez de las variables del crecimiento de la parte aérea; en tanto que, en los sustratos CF+PM-25:75 y CF el VR y BSR tuvieron valor igual en ambos ciclos de producción (Figura 2 E y F). En la primavera la temperatura máxima del aire en el invernadero fue 4 °C mayor en comparación con el otoño, esto influyó en los sustratos (Figura 1) ya que en estos las temperaturas máximas promedio fueron de 26.9, 26.8, 26.7, 26.8, 26.8 °C para los sustratos CF, PM y CF+PM (25:75, 50:50 y 75:25 v/v), respectivamente; en los sustratos V y CF+V (25:75, 50:50 y 75:25 v/v) se registraron 29.4, 28.9, 28.4 y 28.4 °C, respectivamente. Moreno *et al.* (2020) señalaron que en sustratos con CA alta el nivel de oxígeno puede disminuir en épocas o en zonas con temperaturas ambientales altas, ya que el crecimiento y la tasa de respiración de la raíz aumentan y por lo tanto la demanda de oxígeno también. Estas situaciones se presentaron en la presente investigación, y fue en los sustratos V y CF+V-25:75 donde las variables del crecimiento de la parte aérea y de raíz obtuvieron los valores más bajos (Figura 2; Cuadro 4). Witcher *et al.* (2020) evidenciaron que en plantas de tuya (*Thuja standishii*) la biomasa fresca y seca de la parte aérea, y de la raíz fueron de valor mayor en la mezcla de peat moss más corteza de pino (80:20 v/v) en contraste con corteza de pino, donde la mezcla presentó menor temperatura, lo cual lo atribuyeron al mayor contenido de agua. El Sharkawi *et al.* (2014) reportaron para cascarilla de arroz entera compostada (CAC) 27.8 °C, y para las mezclas de CAC-hundzsoil, CAC-polvo de coco, CAC-biochar de cascarilla de arroz y CAC-arena 26.3, 27.2, 26.6 y 27 °C, respectivamente; en los sustratos en mezcla las plantas de pepino (*Cucumis sativus*) obtuvieron el valor más alto del diámetro de tallo, área foliar, biomasa seca de la parte aérea y biomasa seca de raíz en contraste con CAC. Nieto-Garibay *et al.* (2016) señalaron que la adaptación de las plantas a ambientes diferentes puede implicar respuestas diversas, donde una de estas puede ser la adaptación morfológica que incluye cambio en el tamaño de los órganos de la planta. En este trabajo se obtuvo mayor biomasa de la parte aérea en el sustrato CF+PM:50:50 en la primavera (donde la radiación y la temperatura del aire fueron mayores) en relación con el otoño, y también la mayor diferencia de biomasa entre los dos ciclos de producción en relación a los demás sustratos (Figura 2). Esto permitió inferir que la respuesta de las plántulas de albahaca Thai se afectó por las condiciones ambientales de cada ciclo de producción, y también por las condiciones en la raíz, lo cual varió en cada sustrato. De lo anterior, se dedujo que la temperatura en el medio de crecimiento de la raíz depende de la presentación de la cascarilla de arroz, del sustrato con el cual se mezcle y de la zona o época en el año, por lo que se sugiere continuar con investigaciones al respecto.

Los sustratos PM y CF se ubicaron en segundo término en primavera por favorecer cinco variables del crecimiento, aun cuando la CA del sustrato PM y la CaRA en el sustrato CF fueron de valor bajo. En el sustrato PM el VR y la BSR fueron de mayor valor en primavera, y de valor similar con

CF+PM-50:50, CF+PM-75:25, CF+V-75:25 (Figura 2 E, F); en tanto que, en CF y CF+PM-25:75 estas variables fueron iguales en ambos ciclos de producción, pero de valor menor en contraste con los sustratos PM, CF+PM-50:50 y CF+PM-75:25 en primavera. Es probable que el AFD de los sustratos PM, CF y CF+PM-50:50 haya tenido un papel importante en el crecimiento de las plántulas durante el ciclo de primavera, y también en otoño, sin dejar de lado la importancia de las demás propiedades físicas de los sustratos y factores ya señalados. También, el aporte de nutrimentos de los sustratos en primavera se consideró importante, tal como se explicó para el ciclo de otoño.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente se recomienda llevar a cabo más investigación sobre sustratos alternativos para el crecimiento de plántulas considerando todos los factores que puedan estar implicados y que afectan el crecimiento tal como las propiedades físicas de los sustratos, los tipos de sustratos, ciclo de producción o condiciones ambientales, y posible aporte de nutrimentos por los sustratos utilizados.

CONCLUSIONES

La cascarilla de arroz fragmentada al 100 %, y en mezcla con peat moss en proporción 25:75 v/v fueron los sustratos más adecuados para el crecimiento de plántulas de albahaca 'Thai' en otoño; en primavera, la cascarilla de arroz fragmentada más el peat moss proporción 50:50 v/v fue el más adecuado, lo que permitió sustituir en estas proporciones el uso del peat moss en las condiciones de la investigación.

REFERENCIAS

- Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y Caracterización. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Auler, A.C., Galleto, S.L., Silva, A.R. y Verona, R.B. 2015. Lettuce seedlings development index in different substrates using multivariate analysis. Científica. 43: 50-57.
- Bassan, A., Sambo, P., Zanin, G. y Evans, M.R. 2014. Rice hull-based substrates amended with anaerobic digested residues for tomato transplant production. Acta Horticulturae. 1018: 573-582.
- Castoldi, G., Brito, M., Pivetta, L.A., Pivetta, L.G. y De Moraes, M. 2014. Alternative substrates in the production of lettuce seedlings and their productivity in the field. Revista Ciência Agronômica. 45: 299-304.
- Cruz-Crespo, E., Can-Chulim, A., Pineda-Pineda, J., Moreno-Velázquez, D., Aguilar-Benítez, G. y García-Paredes, J.D. 2019. Relación entre las propiedades físicas de mezclas de lombricompost con tezontle, piedra pómez y cascarilla de arroz. Agrociencia. 53: 1-12.
- El Sharkawi, H.M., Abdrabbo, M. y Hassanein, M.K. 2014. Development of treated rice husk as an alternative substrate medium in cucumber soilless culture. Journal of Agriculture and Environmental Sciences. 3: 131-149.

- Garbanzo, G. y Vargas, M. 2014. Determinación fisicoquímicas de diez mezclas de sustratos para producción de almácigos, Guanacaste, Costa. *InterSedes*. 15: 151-168.
- Gerding, M.A.W., Karel, E.H.K. y De Vries, G.E. 2015. The history of the peat manufacturing industry in The Netherlands: Peat moss litter and active carbon. *Mires Peat*. 16: 1-9.
- González, J.A., Richard, E., López-Cervantes, R., Benavides-Mendoza, A. y Cabrera, M. 2016. Las propiedades físicas del sustrato de crecimiento afectan el desarrollo de la fresa cultivar 'Albion'. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 17: 3607-3621.
- Guerrero-Guerrero, E.M. 2021. Evaluación de sustratos bajo un sistema hidropónico en un cultivo de fresa con variables de calidad. *Informador Técnico*. 85(1): 52-63.
- Haygert-Lencina, K., Antônio-Bisognin, D., Kielse, P. y Pimentel, N. 2017. Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa* plantlets. *Agrociencia*. 51: 909-920.
- Kratz, D., Nogueira, A.C., Wendling, I. y Mellek, J.E. 2017. Physico-chemical properties and substrate formulation for *Eucalyptus* seedlings production. *Scientia Forestalis*. 45: 63-76.
- Luna-Fletes, J.A., Cruz-Crespo, E., Can-Chulim, A., Chan-Cupul, W., Luna-Esquível, G., García-Paredes, J. D. y Mancilla-Villa, O. R. 2021. Producción de plántulas de chile habanero con fertilización orgánica y biológica. *Terra Latinoamericana*. 39: 1-13.
- Moncayo, M.R., Álvarez, V.P., González, G., Salas, L. y Chávez, J.A. 2015. Producción orgánica de albahaca en invernadero en la comarca lagunera. *Terra Latinoamericana*. 33: 69-77.
- Moreno, M.J., Pineda, J., Colinas, M.T. y Sahagún, J. 2020. El oxígeno en la zona radical y su efecto en las plantas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11: 931-943.
- Nieto-Garibay, A., Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., Reyes-Pérez, J.J. Hernández-Montiel, L.G. y Yescas, P. 2016. Estrategias fisiológicas de cultivares de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) bajo agricultura Protegida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 17: 3477-3490.
- Pire, R. y Pereira, A. 2003. Propiedades físicas de componentes de sustratos de uso común en la horticultura del estado Lara, Venezuela. *Propuesta metodológica*. *Bioagro*. 15: 55-63.
- Quintero, M.F., Ortega, D., Valenzuela, J.L. y Guzmán, M. 2013. Variation of hydro-physical properties of burnt rice husk used for carnation crops: improvement of fertigation criteria. *Scientia Horticulturae*. 154: 82-87.
- Sambo, P., Sannazzaro, F. y Evans, M.R. 2008. Physical properties of ground fresh rice hulls and sphagnum peat used for greenhouse root substrates. *HortTechnology*. 18: 384-388.
- Steiner, A.A. 1984. The universal nutrient solution. *Memories VI International Congress on Soilles Culture*. Wageningen, The Netherlands.
- Van, M.W. y Dove, S.K. 2014. Temporal dynamics of oxygen concentrations in a peat-perlite substrate. *Acta Horticulturae*. 1034: 355-361.
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega-Baudrit, J. y Porras, M. 2013. Caracterización del subproducto cascarillas de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Revista Científica*. 23(1): 86-101.
- Witcher, A.L., Pickens, J.M. y Blythe, E.K. 2020. Container type and substrate affect root zone temperature and growth of 'Green Giant' *Arborvitae*. *Horticulturae*. 6: 1-11.
- Zanin, G., Bassan, A., Sambo, P. y Evans, M.R. 2011. Rice hulls and peat replacement in substrates for vegetable transplant production. *Acta Horticulturae*. 893: 963-970.

Physicochemical characterization of residual potato (*Solanum tuberosum*) starch recovered from the potato chips industry in Mexico

Caracterización fisicoquímica de almidón recuperado de papa (*Solanum tuberosum*) residual de la industria de papas fritas en México

Montoya-Anaya Diana G.¹, Madera-Santana Tomas J.², Aguirre-Mancilla Cesar L.¹, Grijalva-Verdugo Claudia¹, Gonzales-Garcia Gerardo³, Nuñez-Colín Carlos A.³, Rodriguez-Nuñez Jesus R.^{4,*}

¹ Postgraduate Department, National Technological of Mexico/I. T. Roque, km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Celaya, Guanajuato, 38110, México.

² Food and Development Research Center, A.C. CTAOV, A.P. 1735, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico.

³ Department of Chemistry, DCNyE, University of Guanajuato, Noria Alta s/n. Guanajuato, Gto. 36050, Mexico.

⁴ Biotechnology Program, University of Guanajuato. Mutualismo #303, Colonia La Suiza, Celaya, Guanajuato, 38060, Mexico.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physicochemical, morphological, structural, and thermal properties of starch recovered from *Solanum tuberosum* residual of chips industry in Mexico using advanced instrumental techniques. The residual potato was collected from a chips production company and the starch obtained by aqueous extraction. The starch presented a content of carbohydrates of 87.79 %, proteins (1.18 %), lipids (0.15 %), ashes (0.26 %), and amylose (24.35 %). The water absorption capacity was 1.0163 g g⁻¹, solubility (30.17 - 46.65 %), swelling (2.31 - 8.69 g g⁻¹). Thermal analyzes showed a starch gelatinization about 61.7 - 90 °C with a maximum weight loss at 288.1 °C. The scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS) showed particles of 14 - 69 μm with a composition of 54.3 % carbon, 45.4 % oxygen, and 0.15 % potassium. The dynamic light scattering (DLS) showed particles of nanometric size (120 nm). The nuclear magnetic resonance (NMR) and X-Ray diffraction (XRD) exhibited the crystallinity of the starch as type B (34.73 %) and the Fourier transform infrared spectroscopy-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) showed the functional groups distinctive of the glucose.

Keywords: amylose, crystallinity, functional properties, instrumental characterization, agroindustrial byproduct.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades fisicoquímicas, morfológicas, estructurales y térmicas del almidón recuperado de los residuos de *Solanum tuberosum* de la industria de frituras en México, utilizando técnicas instrumentales avanzadas. La papa residual se recogió de una empresa productora de papas fritas y el almidón se obtuvo mediante extracción acuosa. El almidón presentó un contenido de carbohidratos de 87.79 %, proteínas (1.18 %), lípidos (0.15 %), cenizas (0.26 %) y amilosa (24.35 %). La capacidad de absorción de agua fue de 1.0163 g g⁻¹, solubilidad (30.17 - 46.65 %), hinchamiento (2.31 - 8.69 g g⁻¹). Los análisis térmicos mostraron una gelatinización del almidón entre 61.7 - 90 °C con una pérdida máxima de peso a 288.1

°C. La microscopía electrónica de barrido-espectroscopía dispersiva de energía (SEM-EDS) mostró partículas de 14 - 69 μm con una composición de 54.3 % de carbono, 45.4 % de oxígeno y 0.15 % de potasio. La dispersión dinámica de luz (DLS) mostró partículas de tamaño nanométrico (120 nm). La resonancia magnética nuclear (NMR) y la difracción de rayos X (XRD) exhibieron la cristalinidad del almidón como tipo B (34.73 %) y la reflectancia total atenuada por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR - ATR) mostró los grupos funcionales distintivos de la glucosa.

Palabras clave: amilosa, cristalinidad, propiedades funcionales, caracterización instrumental, subproducto agroindustrial.

INTRODUCTION

The potato (*Solanum tuberosum*) is one of the most economically and socially important foods, currently as the third most consumed crop worldwide, only surpassed by wheat, and rice (Devaux *et al.*, 2021). In 2019, world potato production was 370 million tons, of which Mexico produced more than 1 million, presenting a per capita consumption of 14.8 kg (FAOSTAT, 2020; Devaux *et al.*, 2021). It is estimated that around 56 % of the national production is used for fresh consumption, processing companies demand 29 %, while 15 % is destined for seed (Mejía and Castellanos, 2018).

In the industrialization of this tuber, approximately 88.9 % of the product is used, the remaining percentage corresponds to the residues generated (Calvache *et al.*, 2022). For the processing of potatoes, both external (size, shape, presence of diseases, defects, deformations, cold and mechanical damages) and internal (total solids, non-reducing and total sugars, flavor, and nutritional value) characteristics are considered to ensure the quality of the final product, those that do not meet the requirements are rejected and considered waste (Ortega and Andrade-Bolaños, 2021).

About 25 % of the waste generated during potato processing is disposed of in sanitary landfills, in unsuitable places or deposited in agricultural plots for degradation, without going through a process that gives them an add

value (Sánchez-Castelblanco and Heredia-Martín, 2021; Calvache *et al.*, 2022). The concern for the use of residues has gained great strength worldwide, in the scientific community and especially at the industrial level, where production processes generate by-products that can be useful in other activities (Quintero *et al.*, 2015), such as use of starch in the case of potato, since, in addition to its importance as a food, it has expansive uses in the industry mainly due to its starch content (Jagadeesan *et al.*, 2020).

Starch is a polysaccharide composed of glucose monomers that form the amylose (20 - 30 %) and amylopectin, the amylose is formed by 1,4- α -D-glucose monomers with a linear structure and small number of long branches, meanwhile, the amylopectin is formed by 1,6- α -D-glucose monomers with a high-density branched chain, these branching occurs every 20 to 23 glucose units (González-Cuello *et al.*, 2016; Kowsik and Mazumder, 2018). The amylose-amylopectin ratio varies significantly between starches depending on their source, such as the type and variety of plant or fruit, as well as growth conditions. Several studies have shown that this variation involves changes in their physicochemical characteristics and interactions with other molecules, resulting in different functional and microscopic properties, as well as different texture and stability of starch products (Lemos *et al.*, 2019). Then, it is possible to recover and make an advanced characterization of the residual potato starch used in the manufacture of potato chips in Mexico.

Potato starch is preferred over others, because its paste has high clarity and neutral flavor (Alvani *et al.*, 2011), attributed to the high content of phosphate esters in the amylopectin chain (Šimková *et al.*, 2013). In 2015, the starches annual world production was approximately 85 million tons (Dupuis and Liu, 2019), with corn, wheat, potato, and rice starch being the main sources, accounting for 84 %, 7 %, 4 % and 1 %, respectively (Basiak *et al.*, 2017). This starch is widely used in industrial sectors, such as food, feed, paper, textiles, laundry finishes, chemical, petrochemical, pharmaceutical industries, bioethanol, construction materials and biodegradable products (Maniglia *et al.*, 2020). In this sense, the objective of this study was to evaluate the physicochemical, morphological, structural, and thermal properties of starch recovered from potato (*Solanum tuberosum*) residual of chips industry in Mexico, using advanced instrumental techniques, to offer alternatives for the recycling of residual potatoes.

MATERIALS AND METHODS

Starch extraction

The residual potato was collected from a chips production company, located in the industrial zone in the state of Mexico, Mexico. It was then washed, the skin removed, and their size was reduced using a homemade grater. The grated potatoes were soaked for 30 min with constant manual agitation (100 g of potato/200 mL of water), then filtered using a domestic sieve; this process was repeated three times (50 mL of water/100 g of potato). The filtrate was left undisturbed for 1 hour and the starch recovered by decantation and subjected

to two washes using distilled water. Finally, the recovered starch was dried at 60 °C and stored in hermetically sealed plastic bags until use (Vargas *et al.*, 2016).

Proximate composition analysis

Moisture content was determined using a thermobalance (OHAUS™ MB35) according to Pardo *et al.* (2013), total ash content was determined using the dry ash method (Kirk *et al.*, 1991), and protein content was determined by the Kjeldahl method (factor of 6.25), according to the Official Mexican Standard NOM -F-68-S -1980. Additionally, the Soxhlet method was used to determine the total lipid content (James, 1999) and total carbohydrates were estimated as the percentage remaining to reach 100 % of the proximal composition (Valle *et al.*, 2019).

Amylose content was determined using the methodology of Hoover and Ratnayake (2001). Specifically, defatted starch (25 mg) was dissolved in 10 mL of 90 % dimethylsulfoxide (DMSO), stirred for 20 min, and then maintained for 15 min in a water bath at 85 °C. The mixture was cooled and gauged with 25 mL of distilled water. An aliquot (1 mL) was taken and diluted with 5 mL of iodine solution (0.0025 mol L⁻¹) in potassium iodide (0.0065 mol L⁻¹) (I₂/KI) and gauged to 50 mL with distilled water. The absorbance was read at 600 nm using a spectrophotometer (Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, USA), mixtures of DMSO and iodine solution in potassium iodide were used as blank. The amylose content of the starch sample was determined using a standard curve prepared from potato amylose and amylopectin mixtures (Sigma Aldrich, Edo. de México), containing 0 - 100, 10 - 90, 20 - 80, 30 - 70, 40 - 60, 50 - 50, 60 - 40, 70 - 30, 80 - 20, 90 - 10 and 100 - 0 % treated in the same way as starch solutions. All determinations were analyzed in triplicates.

Functional properties

Water absorption capacity

To determine the starch water absorption capacity, suspensions of 5 % starch in 40 mL of distilled water were prepared, left to stand for 40 min with stirring every 10 min, and centrifuged (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8 Centrifuge) at 3250 rpm for 25 min at 25 °C. The supernatant was discarded, and the sediment was weighed to determine the adsorption capacity (eq.1). The test was performed in triplicate (Sindhu *et al.*, 2019).

$$\% \text{ WAC} = \frac{\text{sediment weight (g)} - \text{initial sample weight (g)}}{\text{initial sample weight (g)}} \quad \text{eq.(1)}$$

Solubility and swelling power

The determination of the solubility index (SI) and swelling power (SP) was determined by the method of Meaño *et al.* (2014) with some modifications. Specifically, 1 % starch suspensions were prepared in 40 mL of distilled water, heated in a water bath (Ecoline Staredit. LAUDA® E100) at 60 °C, 70 °C, 80 °C and 90 °C for 30 min, then cooled to 25 °C, and centrifuged (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8 Centrifuge) at 4000 rpm for 50 min.

The supernatant was discarded, while the gel formed was recovered and dried at 60 °C for 20 hours to determine the SI (eq.2) and the SP (eq.3).

$$SI(\%) = \frac{\text{dry gel weight (g)}}{\text{initial sample weight (g)}} \times 100 \dots\dots \quad \text{eq.(2)}$$

$$SP(g/g) = \frac{\text{wet gel weight (g)}}{\text{initial sample weight (g)} - \text{dry gel weight (g)}} \quad \text{eq.(3)}$$

Morphological and optical analysis
Scanning electron microscopy (SEM) and elemental analysis (EDS)

Morphological analysis of the starch surface was performed at 100X and 200X using a scanning electron microscope (JEOL, JSM-7600 F, Japan). Starch particles were coated with a thin layer of Au-Pd using a sputter coater (Quorum Q150R-ES, Sussex, UK) before scanning. The morphological analysis of starch particles was performed to investigate size and shape. In addition, the elemental composition of samples was analyzed using an Oxford X-Max 20 energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) detector and an Oxford wavelength dispersive X-ray spectroscopy (WDS) detector (Acosta-Ferreira *et al.*, 2020).

Dynamic Light Scattering (DLS)

Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of starch were determined using a DLS instrument, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), according to the method reported by Sattari *et al.* (2017), with some modifications. Specifically, 1.2 mg of the sample was dissolved in 2 mL of 95 % EtOH, subsequently sonicated for 5 min in an ultrasound bath to disintegrate the starch granules, and then placed in a polystyrene cuvette for reading in the equipment. All results were recorded as the average of 5 measurements.

Color

Starch color was determined using a Chroma Meter colorimeter (Minolta CR-400 Japan) calibrated with a white mosaic standard (Y = 94.1; X = 0.3155; Y = 0.3319). Color was read using the CIE Lab scale and measured (L) luminosity (0 black to 100 white) and chromaticity parameters a* (- 100 green to + 100 red) and b* (- 100 blue to + 100 yellow). Five replicates of the sample were analyzed, placed on the pattern. The color difference (ΔE) was calculated using equation 4.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{eq.(4)}$$

Where $\Delta L^* = L^* - L_0$, $\Delta a^* = a^* - a_0$ and $\Delta b^* = b^* - b_0$. L_0 , a_0 and b_0 represent the color parameters of the standard, while L^* , a^* and b^* represent the color parameters of the sample (Gonçalves *et al.*, 2020).

Thermal analysis

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Starch gelatinization properties were analyzed using a Differential Scanning Calorimeter (DSC) on a Discovery model from TA Instruments Inc. (New Castle, DE). Specifically, 10 mg of sample were placed in aluminum cells and sealed under pressure. An empty aluminum cell was used as a reference. Both cells were heated from 20 to 180 °C at a heating rate of 10 °C/min and then rapidly cooled to 20 °C. The thermal parameters determined of the gelatinization peak were, initial temperature (To), maximum temperature (Tp), final temperature (Tf) and gelatinization enthalpy (ΔH), typical of the starch gelatinization process (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2014).

Thermogravimetric analysis (TGA/DTGA)

Thermal decomposition of starch was analyzed using a TA Instruments Discovery Model Thermogravimetric Analyzer (TGA) (New Castle, DE). A sample of approximately 20 mg was heated from 50 to 600 °C at a heating rate of 10 °C/min, under an inert N₂ atmosphere with a flow rate of 60 mL/min (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2014).

Structural analysis

NMR spectra

¹³C nuclear magnetic resonance analyzes were performed on a Bruker Avance III spectrometer (USA, Massachusetts) operating at 500 MHz using CDCl₃. NMR spectra were referenced using the residual signal of CHCl₃ at 77.26 ppm (chemical shifts) (Gómez and González-García, 2018).

X-ray diffraction (XRD)

To determine the crystalline structure of starch, a powder sample was placed in a sample holder for X-ray diffractometry. The X-ray diffraction patterns were obtained using a Bruker D8-Advance Bragg diffractometer (Bruker, Billerica, MA, USA) with a Bragg Brentano geometry and monochromatic CuKα radiation (λ = 1.541 Å), operated at 40 kV and 30 mA. The X-Ray diffraction patterns were recorder in reflection mode in an angular range of 5° to 60° (2θ), with a step time of 0.5 s and a step size of 0.02°. The crystallinity was calculated according to equation 5 (Aguilar-Pérez *et al.*, 2020).

$$1 - \frac{\text{maximum peak}}{\text{minimum peak}} \times 100 \quad \text{eq. (5)}$$

FTIR-ATR spectrophotometry

Attenuated total reflectance infrared (FTIR-ATR) spectra of starch were obtained at room temperature using a Thermo Nicolet model Nexus 670-FTIR spectrometer (Madison, WI). The samples were analyzed in the range of 4000 - 600 cm⁻¹, with 4 cm⁻¹ resolution and 100 scans, the OMNIC software was used to obtain the results (Madera-Santana *et al.*, 2016).

Statistical analysis

Data were presented as average of triplicate measurements \pm standard deviation. The results obtained in percentage form were transformed to a arcsine to optimize the normality of the data. An analysis of variance (ANOVA) was performed with a completely randomized design (DCA) and a level of significance ($p \leq 0.05$), the Tukey test was applied to determine significant differences between means using the SAS statistical analysis software (version 9.3).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition analysis

The proximal composition of the potato starch is shown in Table 1. Similar moisture values were reported by Bravo and Chavarría (2020) with 12.6 % for Leona Blanca variety potato starch, while Acosta *et al.* (2018) indicated higher values (16.9 - 20.8 %). Dry starches usually have a humidity that ranges between 6 - 16 %; this variation is due to the environment and the drying process employed, however, the humidity should not exceed 13 %, since high levels can cause microbial damages and deteriorate quality (Moorthy, 2002).

Table 1. Proximal composition of residual potato starch.

Tabla 1. Composición proximal de almidón de residuos de papa.

Components	Results (%)
Moisture	10.60 \pm 0.14
Ash	0.26 \pm 0.02
Lipids	0.15 \pm 0.02
Protein	1.18 \pm 0.06
Carbohydrate	87.79 \pm 0.16
Amylose	24.35 \pm 6.70

The results obtained in this work for ashes, lipids, proteins, and carbohydrates were similar to those reported in previous studies. In this sense, Bravo and Chavarría (2020) reported a proximal composition of potato starch (Leona Blanca variety) with 0.12 % lipids, 0.35 % proteins and 85.87 % carbohydrates, Pardo *et al.* (2013) mentioned a 0.23 - 0.44 % range for ashes and 0.28 - 0.33 % for protein in potato starch, and Vargas *et al.* (2016) reported values of 0.43, 0.3 and 98.8 % of ashes, lipids, and carbohydrates, respectively, for potato starch (Única variety).

The variation in the proximal composition of starches has been reported between and within botanical species, since they are influenced by various factors such as growth, development conditions of the plant and the variety used, showing a direct effect on interactions with other molecules, resulting in different physicochemical, functional, and microscopic properties (Martínez *et al.*, 2019a; Lemos *et al.*, 2019).

The amylose content was another important parameter evaluated because it allows to categorized starches as, waxy (< 15 %), normal (20 - 35 %) or high (> 40 %) (Gonçalves *et al.*, 2020). In the present study, starch was identified as normal (24.35 % amylose), similar to those reported by Torres *et al.* (2020) and Solarte-Montúfar *et al.* (2019) with ranges of 15.6

- 29.3 % and 24.8 - 26.2 % amylose, respectively, in potato starch of different varieties.

These characterization studies are fundamental since they allow deciding the most promising uses of each starch in the different industrial sectors where it is used, and ruling out those for which its characteristics are undesirable. For example, in the use of starch as a food additive, the amylose-amylopectin ratio influences the clarity or opacity of solutions, amylose also provides greater thermal stability to pastes and also exhibits excellent film-forming properties compared to amylopectin, so in this type of industry a high amylose content becomes a desirable characteristic (Solarte-Montúfar *et al.*, 2019).

Functional properties

Water absorption capacity (WAC)

The obtained water absorption capacity (WAC) of potato starch was 1.0163 \pm 0.0078 g g⁻¹ (101.63 \pm 0.77 %), a value close to that reported by Sarifudin *et al.* (2020) with 100 %, meanwhile, Cao and Gao (2020) and Chuiza-Rojas *et al.* (2021), reported a higher water absorption capacity of 1.81 gg⁻¹ and 1.87 g g⁻¹, respectively, for potato starch. Potato starch contains phosphate ester groups that provide a higher WAC and a faster rate of hydration compared to cereals starch, which is reflected in a higher viscosity during cooking. This property indicates the ability of starch to interact with water and to form pastes or gels; in addition, its use as food additive allows determining the texture and quality of food, so that starches that have a high WAC usually intended for this industrial sector, especially as a thickening agent (Solarte-Montúfar *et al.*, 2019; Jiménez-Villalba *et al.*, 2019).

The WAC of starch is influenced by granule size (small granules, characteristic of amylopectin, retain more water than large granules, typical of amylose), and the presence of hydrophilic groups (which have a high-water retention capacity) (Guízar *et al.*, 2008; Babu and Parimalavalli, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Sangokunle *et al.*, 2020).

Solubility index and swelling power

The starch, subjected to high temperatures and excess of water, show a gelatinization process due to the breaking of the crystalline structure allowing the union of water molecules with the -OH groups of the amylose and amylopectin through hydrogen bonds, promoting the solubility and swelling processes (Soto and Oliva, 2012). The water solubility index is a measure of the amount of amylose that is released from inside the granule when it begins to lose its structure by the effect of water absorption (Huamani-H *et al.*, 2020); the results obtained in the present work are shown in table 2. In this sense, Sindhu *et al.* (2019) reported values similar to those obtained in this study, with 31.32 % for buckwheat starch. Meanwhile, Martínez *et al.* (2015) reported a lower solubility value for potato starch (4.8 - 20.8 %).

An increase in starch solubility index has been reported with increasing temperature (Martínez *et al.*, 2017), however, in the present work the maximum solubility index values

Table 2. Solubility index and Swelling power of residual potato starch.
Tabla 2. Índice de solubilidad y poder de hinchamiento de almidón de residuo de papa.

Temperature °C	Solubility index (%)	Swelling power (g g ⁻¹)
60	42.87 ± 3.95 ^a	2.31 ± 0.11 ^c
70	46.65 ± 0.39 ^a	6.12 ± 0.40 ^b
80	36.52 ± 0.66 ^b	8.24 ± 0.66 ^a
90	30.17 ± 0.31 ^c	8.69 ± 0.45 ^a

were reached between 60 °C and 70 °C, with a decrement at 80 °C and 90 °C. Guizar *et al.* (2008) reported a similar behavior, with maximum solubility index values between 70 - 80 °C, and a subsequent decrease at 90 °C for sweet potato starch, attributed to the fact that when reaching the maximum solubility, the starch components (amylose-amylopectin) begin to interact with each other forming insoluble complexes, which precipitate decreasing the solubility index.

The swelling power indicates the ability of starch granules to hydrate under cooking conditions (Olu-Owolabi *et al.*, 2011) and can be affected by their minor components (lipids, proteins, etc.) that prevent interaction with water, prior treatment, and processing conditions (Solarte-Montúfar *et al.*, 2019). Martínez *et al.* (2015) and Babu and Parimalavalli (2014) reported a swelling power of 11 - 26.9 g g⁻¹ for potato starch and 3 - 14 g g⁻¹ for sweet potato starch, respectively, similar to those reported in this work.

As the temperature increases, the intergranular forces of the starch weaken, thus facilitating the penetration of water into the crystalline zone, so that the granules swell and increase in volume. Once the amorphous part is hydrated, the maximum swelling point occurs (Olu-Owolabi *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2017). The results observed at 80 °C in this work are very close to the final gelatinization temperature (Tf: ~ 90 °C) evaluated by DSC, corroborating that mentioned by Chacón *et al.* (2020), who attribute a direct relationship between solubility index and swelling power with starch gelatinization temperature. It is worth mentioning that various studies have attributed that solubility is mainly affected by amylose content, while amylopectin affects swelling power characteristics (Yadav *et al.*, 2019).

MORPHOLOGICAL AND OPTICAL ANALYSIS

Scanning electron microscopy (SEM) and elemental analysis (EDS)

The starch sample showed a wide particle size distribution ranging from 14 to 69 µm, as well as an oval shape with a smooth surface (Figure 1). Conglomerates can be observed as a result of electrostatic charges between large and small particles. In this sense, Morales (2012) mentions a size of 5 to 100 µm for potato starch particles, while Ramírez *et al.* (2017) reported an average size of 27.1 µm.

Both size and shape turn out to be important in the characterization of starches, since they have a great influence on their properties and applications (Jaiswal and Chibbar, 2017), these characteristics are related to amylose and amy-

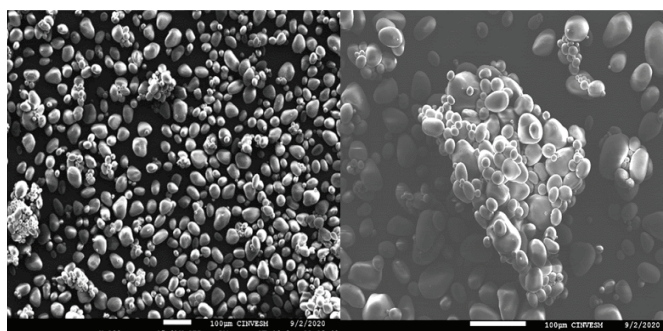


Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) of residual potato starch. a) 100X magnification, b) 200X magnification.

Figura 1. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de almidón de residuo de papa. a) ampliación a 100X b) ampliación a 200X.

lopectin within starch granules, since the amylopectin chains form small oval granules, while amylose tends to form larger granules (Hernández *et al.*, 2017). This is corroborated by Chuiza-Rojas *et al.* (2021) who reported a size of 6.2 µm and a relatively low amylose content of 19.28 % compared to that obtained in this study (24.35 %), which was reflected in larger particles (14 - 69 µm).

Scanning electron microscopy with energy dispersive detector (EDS) allows knowing part of the simple chemical composition of starch (Table 3). The potato starch sample showed a simple composition of 54.39 % carbon, 45.46 % oxygen, and 0.15 % potassium. Bahrami *et al.* (2019) reported a similar chemical composition for potato starch, with 59.31 % carbon and 40.69 % oxygen, while Hernández *et al.* (2017) indicated a composition of 76.43 % carbon and 23.23 % oxygen. The potassium detected in this test is due to the composition of the starch, since the presence of minerals such as calcium, magnesium, sodium, iron, phosphorus, and potassium has been reported (Meaño *et al.*, 2014).

Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS allows to determine the nanometric size of particles such as starch, as well as the size distribution (Ji *et al.*, 2016). In this sense, the DLS results showed colloids with a nanometric size of approximately 120 ± 18.87 nm. The DLS procedure has a sonication step where the conglomerate particles are separated, which allowed measuring the size of the colloids present in the sample. Garcia-Gurrola *et al.* (2019) and Ang *et al.* (2022) reported a similar procedure used for DLS analysis and demonstrated that the increase in particle size is attributed to associations of amylopectin chains that induce a variation in starch properties, such as rheology.

Table 3. Elemental composition by EDS of residual potato starch.

Tabla 3. Composición elemental por EDS de almidón de residuo de papa.

Element	Weight (%)	Atomic (%)
C _K	47.11	54.39
O _K	52.46	45.46
K _K	0.43	0.15
Total	100.00	100.00

The determination of the starch particles nanometric size resulted interesting, since these are for example, usually used in drug delivery systems (Zhou *et al.*, 2014), however the characteristics that define the use of nanoparticles also consider the distribution in size and surface charge as they affect physical stability and distribution in vivo (Jimenez, 2022).

The polydispersity index (PDI), which shows the colloidal quality of the particles, was 0.3028 ± 0.12 , showing the starch obtained a monodispersed distribution (narrow size distribution) according to previous reports which showed that values less than 0.7 indicate a monodisperse distribution and those in the range of 0.7 to 1 indicate low quality with a large size distribution (Lancheros *et al.*, 2014; García-Gurrola *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2021). Sana *et al.* (2019) reported a particle size for corn starch of 175 to 248 nm with a PDI of 0.2 to 0.3 and Naderizadeh *et al.* (2018) indicated a particle size of 230 to 240 nm and PDI of 0.26 for potato starch particles, both studies showed similar PDI values to that obtained in the present study.

The zeta potential is indicative of the magnitude of electrostatic repulsion/attraction between particles that influence the stability of the colloid, the value obtained was 6.14 ± 0.41 mV, indicating an unstable suspension ($\pm 0 - 10$ mV); since this superficial charge is close to zero, the particles are considered neutral with a tendency to form aggregations and precipitate. The zeta potential is an important tool when making formulations, since stability tests are shortened by predicting it, reducing time and costs, in addition to improving the useful life and helping to understand the state of the surface of a nanoparticle (Jeong and Shin, 2018; Ahmad *et al.*, 2020). Previous work has reported zeta potential in this range, Chavez da Silva *et al.* (2017) mentioned a value of -8.67 mV and Haaj *et al.* (2014) pointed out values of 3 mV, considering that suspended solids have a neutral charge so close to zero. The variability of the zeta potential of colloids or suspended particles are influenced by the chemical nature of the polymer, pH, solvent, and the stabilizing agent (Piña-Barrera *et al.*, 2021).

Color

Starch color is an important quality parameter, which influences the acceptability of the product by consumers (Too *et al.*, 2022). In this study the colorimetric analysis of starch showed a medium luminosity (40.42 ± 0.44), since sodium metabisulfite or any other antioxidant that favored the whiteness of the starch was not used in the extraction. The values of the parameters a^* (0.06 ± 0.02) and b^* (2.86 ± 0.09) with an inclination to reddish and yellow color, respectively, indicate a tendency to neutral color (Martínez *et al.*, 2019b). Verma *et al.* (2018) reported similar values (0.16 for a^* and 2.58 for b^*), however, they mentioned a higher luminosity (98.81). Likewise, Kumar *et al.* (2020) reported a luminosity of 96.68 and values of -0.14 and 1.89 for parameters a^* and b^* , respectively, in both cases for potato starch.

Thermal analysis

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC thermograms (Figure 2) allowed us to observe the changes that occurred in the potato starch gelatinization process, which presented an initial temperature (T_0) of said process to 61.78 °C, while the maximum temperature (T_p) was observed to 64.45 °C and the final temperature (T_f) was recorded at around 90 °C, and the enthalpy of gelatinization (ΔH) was 10.96 J/g. These results are similar to those reported by Gonçalves *et al.* (2020), with values of T_0 (55.1 °C and 58.2 °C), T_p (59 °C and 62 °C) and T_f (71.4 °C and 74.4 °C) and a ΔH of 11.8 J/g and 12.7 J/g, for recovered and commercial potato starch, respectively. On the other hand, Alvani *et al.* (2011) reported values of T_0 (58.7 °C to 62.5 °C), T_p (62.5 °C to 66.1 °C) and T_f (68.7 °C to 72.3 °C) and ΔH that ranged between 15.1 and 18.4 J/g, for potato starches.

In the present work, an endothermic peak was observed at 114.56 °C, attributed to the dissociation of the amylose-lipid complex. In this sense, Genkina *et al.* (2014) reported a peak around 95 °C for corn starch and mentioned that the fusion of these complexes is a reversible process, contrary to the phase transition of amylopectin. These changes in the transition temperature of starch are attributed to its

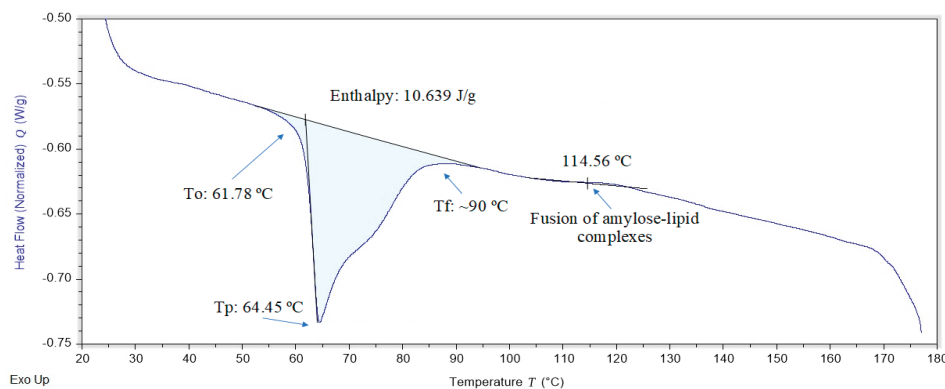


Figure 2. Differential scanning calorimetry (DSC) of residual potato starch.

Figura 2. Calorimetría diferencial de barrido (CDB) de almidón de residuo de papa.

botanical source, its crystallinity and composition, since the amylose content is negatively correlated (Li *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2019). Furthermore, lipids are a determining factor, since their presence results in a gelatinization process at higher temperatures (Alvani *et al.*, 2011).

On the other hand, enthalpy values (ΔH) are positively correlated with crystal concentration, being an indicator of the loss of molecular order. Then, low enthalpy values indicate that less energy is required to start the gelatinization process. Enthalpy is also related to the shape, size, and presence of phosphate esters in starch granules (Alvani *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Thermogravimetric analysis (TGA/DTGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermogravimetric analysis (DTGA) of potato starch describe its thermal stability (Figure 3). Starch shows three zones of weight loss within a temperature range of 20 - 500 °C. The first mass loss of 4.09 % detected at 49.22 °C is attributed to the evaporation of water, the other two regions comprised at 288.17 °C and 474.90 to 482.25 °C, represent the greater mass loss of 53.2 % and 96.17 %, respectively, due to the thermal degradation of starch and proteins (Thakur *et al.*, 2021; Gui *et al.*, 2022), the residual mass (ash) was detected at 600 °C (0.82 %). These results are similar to those reported by Gui *et al.* (2022), with two mass loss zones between 30 - 150 °C and 150 - 750 °C. Similarly, Li *et al.* (2022) pointed out two degradation zones in the same temperature ranges, specifically at 70 °C and 300 °C, in both cases for potato starch.

Structural analysis

NMR spectra

Figure 4 shows the ^{13}C NMR spectrum of potato starch in the range of - 20 to 230 ppm. The NMR spectrum detected

the presence of five peaks between 60 - 105 ppm. The peak recorded around 60 ppm is due to carbon 6 of the glucose unit, while the wide peak observed between 70 and 80 ppm is related to carbons 2, 3 and 5, C4 was detected at 80 ppm, while carbon 1 presents two peaks around 100 of ppm, thus corroborating the structure of the starch monomer (glucose) (Thérien-Aubin *et al.*, 2007; Šoltýs *et al.*, 2019).

The C1 resonance peak provides information about the conformation of the starch molecule, crystallinity, and double-helix symmetry. For type A crystallinity, the C1 resonance presents three peaks at 102, 101 and 100 ppm, whilst, type B (characteristic of potato starch) presents two peaks at 101 and 100 ppm, as observed in this study. According to Meaño *et al.* (2016) the amylose content for type B starches (25 - 30 %) is higher compared to type A, as is the size of the granules, which agrees with the results obtained in this investigation. The broad C1 resonance peak around 103 - 104 ppm is typical of single helices, both in amorphous and crystalline V phase, suggesting a higher proportion of short amylopectin chains attributed to degradation (Thérien-Aubin *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017).

X-ray diffraction (XRD)

X-ray diffraction of potato starch was performed to examine its amorphous, semi-crystalline or crystalline structure. X-ray patterns identified crystalline structures, characteristic of amylopectin (Pardo *et al.*, 2013), which can classify starch into types A-C. Type A crystallinity starch shows two strong diffraction peaks between 15° and 23° and a doublet at 17° and 18°, type B crystallinity produces a strong diffraction peak at 17° and low intensity peaks between 15 - 24°, while type C is a mixture of A and B (Ma *et al.*, 2022).

As shown in Figure 5, the diffraction showed type B crystallinity patterns typical of potato starch, with a strong

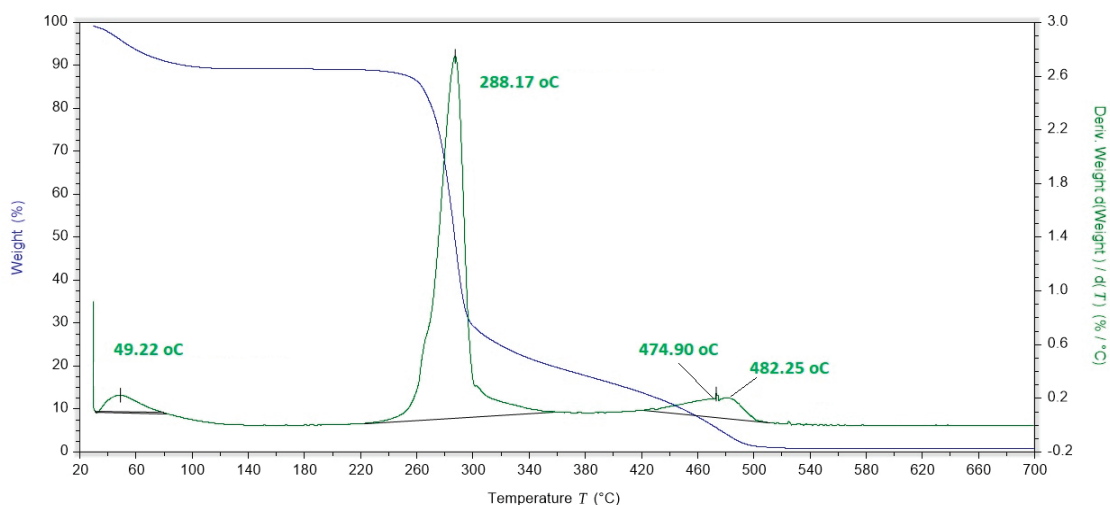


Figure 3. Thermogravimetric analysis (TGA) and curves of thermogravimetric differential analysis (DTGA) of residual potato starch.

Figura 3. Análisis termogravimétrico (ATG) y curvas de análisis termogravimétrico diferencial (ATD) de almidón de residuo de papa.

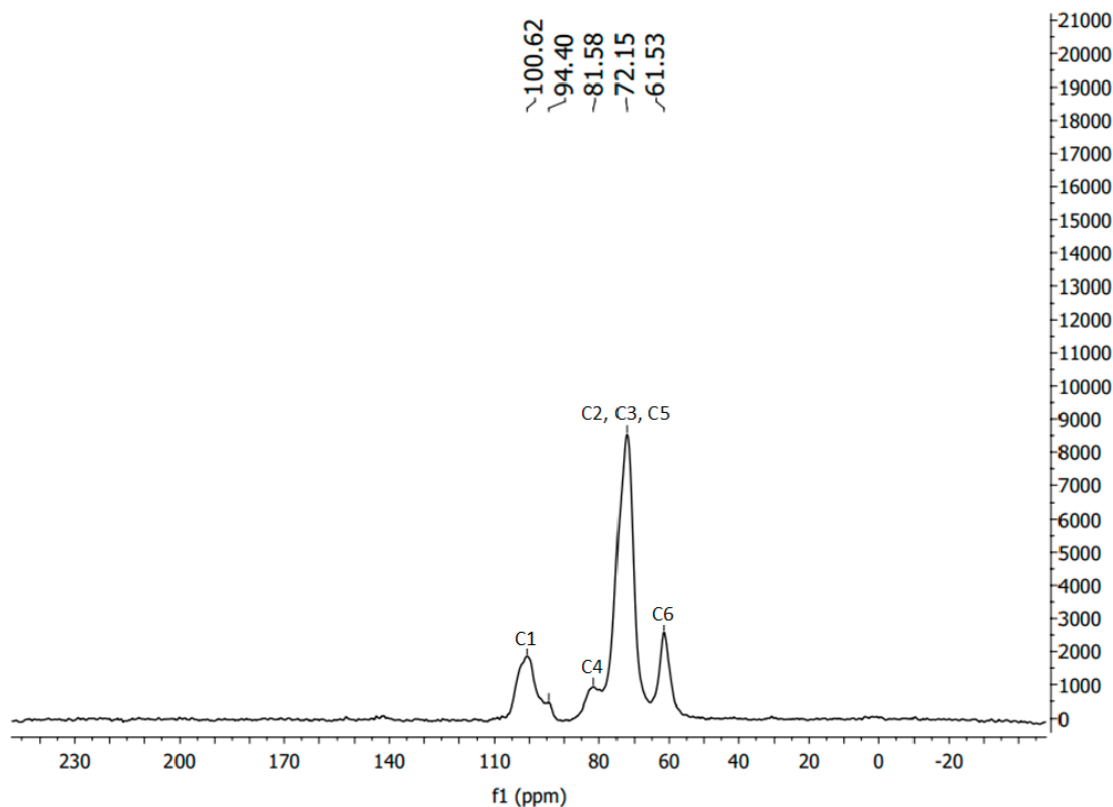


Figure 4. Nuclear magnetic resonance (NMR) of residual potato starch.
Figura 4. Resonancia magnética nuclear (RMN) de almidón de residuo de papa.

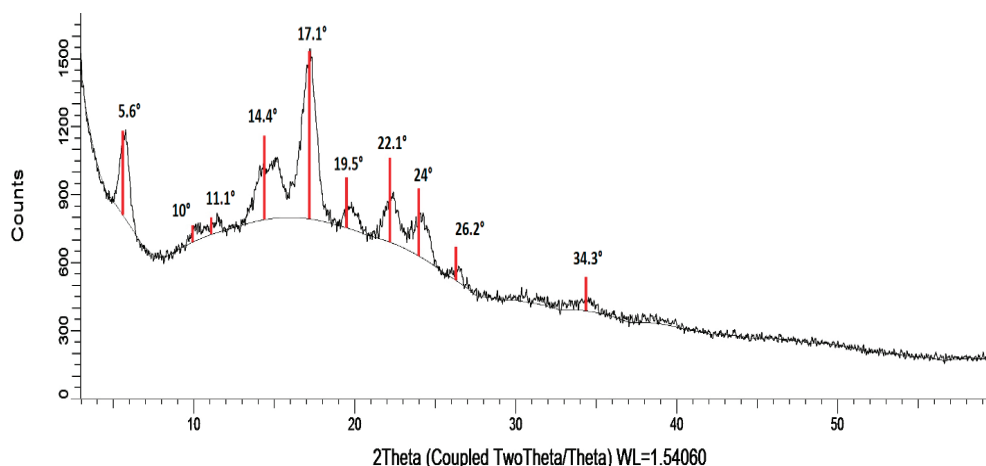


Figure 5. X-ray diffraction (XRD) spectrum of residual potato starch.
Figura 5. Espectros de difracción de rayos X (DRX) de almidón de residuo de papa.

diffraction peak at 17.1° and low intensity peaks between a range of $5.6 - 26.2^\circ$, corroborating the results obtained by NMR. The degree of starch crystallinity was estimated at 34.73 %, values similar to those reported by Núñez-Santiago *et al.* (2011) and Gui *et al.* (2022) who reported 32.3 % and 31.5 % crystallinity, respectively, for commercial potato starch in both cases.

FTIR-ATR spectrophotometry

The glucose (starch monomer) structure previously detected with NMR, was corroborated with the detection of their functional groups by FTIR-ATR spectrophotometry (Figure 6). Signals were observed at wave numbers of 763, 858 and 929 cm^{-1} , which are attributed to the stretching of the ether groups (C-O-C) of the glucose ring, in addition, the band

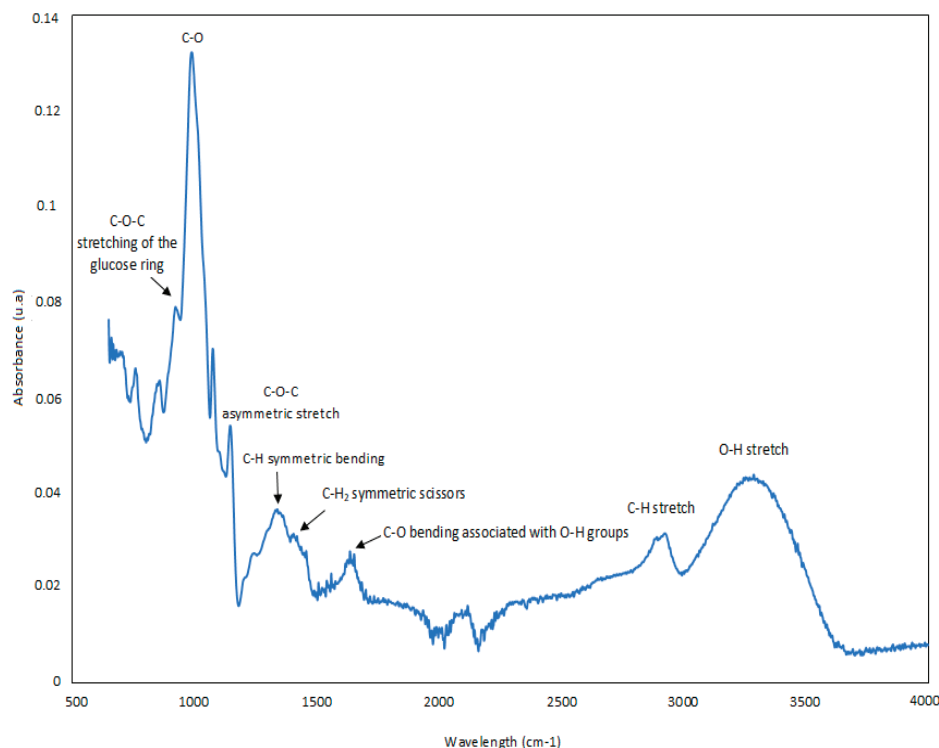


Figure 6. FTIR-ATR spectrum of residual potato starch.
Figura 6. Espectros FTIR-ATR de almidón de residuo de papa.

observed between 993-1082 cm^{-1} was due to the C-O bonds stretching. The presence of an absorption band around 1157 cm^{-1} indicated an asymmetric stretching of the C-O-C groups. Symmetric double vibration of C-H bonds and symmetric deformation of CH_2 groups were observed at wavelengths 1381 and 1437 cm^{-1} , respectively. The absorption band around 3300 - 3600 and 2900 cm^{-1} indicated the presence of hydroxyl functional groups (-OH) and C-H bonds, respectively. The C-O bending associated with the -OH groups showed an absorbance peak around 1648 cm^{-1} . The absorbance peak at 1415 cm^{-1} implies the presence of a symmetric scissors of the CH_2 groups. The unusual CO_2 peak (2358 cm^{-1}) observed in the starch IR spectrum could be the result of the measurement conditions (Torres *et al.*, 2015; Abdullah *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

The extraction process has influence on the starch color parameters, mainly in the luminosity parameter. The NMR and XRD-ray diffraction allowed the identification of the potato starch crystallinity as type B. The SEM-EDS revealed particles of oval shape and the formation of conglomerates, with an elemental composition of carbon, oxygen, and potassium, and DLS showed a narrow size distribution with a zeta potential close to zero, considering the particles in suspension as neutral. In addition, the FTIR-ATR spectrum corroborated the chemical structure of starch, and the TGA thermogram showed the presence of different stages of weight loss, while the DSC thermogram showed the behavior of the

starch gelatinization process, whose temperature showed a direct relationship with solubility and swelling power. The results found in the present work show the relationship between the chemical components of potato starch and its thermal, structural, and morphological behavior, which are important due to the wide range of applications attributed to this product. Residual potato is an excellent source of high-quality starch due to its physicochemical, thermal, and structural characteristics, resulting in a good alternative for the recycling of residual potato from the chips industry in Mexico. In addition, the use of this residual potato presents an excellent alternative to solve the environmental impact of agroindustrial waste.

ACKNOWLEDGMENTS

SEM-EDS, TGA, DSC, DLS and XRD measurements were carried out at LANNBIO Cinvestav Merida, with the support of the FOMIX-Yucatan 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 and 204822 projects. To Drs. Patricia Quintana Owen, William Santiago Gonzalez and Victor Rejon M, for the support provided in the different characterization analyzes of the starch.

REFERENCES

- Abdullah, A.H.D., Chalimah, S., Primadona, I., and Hanantyo, M.H.G. 2018. Physical and chemical properties of corn, cassava, and potato starches. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 160:012003. doi: 10.1088/1755-1315/160/1/012003

- Acosta, J., Gomajoa, H., Benavides, Y., Charfuelan, A., and Valenzuela, F. 2018. Evaluación del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) en la obtención de bioplástico. Bionatura Conference Series 1. doi: 10.21931/RB/CS/2018.01.01.2
- Acosta-Ferreira, S., Castillo, O.S., Madera-Santana, J.T., Mendoza-García, D.A., Núñez-Colín, C.A., Grijalva-Verdugo, C., Villa-Lerma, A.G., Morales-Vargas, A.T., and Rodríguez-Núñez, J.R. 2020. Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia. Biotechnology Reports. 28: e00554. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00554
- Aguiar-Perez, D., Vargas-Coronado, R., Cervantes-Uc, J.M., Rodríguez-Fuentes, N., Aparicio, C., Covarrubias, C., Alvarez-Perez, M., Garcia-Perez, V., Martínez-Hernandez, M., and Cauch-Rodríguez, J.V. 2020. Antibacterial activity of a glass ionomer cement doped with copper nanoparticles. Dental Materials Journal. 39: 389-396. doi:10.4012/dmj.2019-046
- Ahmad, M., Gani, A., Hassan, I., Huang, Q., and Shabbir, H. 2020. Production and characterization of starch nanoparticles by mild alkali hydrolysis and ultra-sonication process. Scientific Reports. 10: 3533. doi:10.1038/s41598-020-60380-0
- Alvani, K., Qi, X., Tester, R.F., and Snape, C.E. 2011. Physicochemical properties of potato starches. Food Chemistry. 125: 958-965. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.088
- Ang, C.L., Matia-Merino, L., Sims, I.M., Sargison, L., Edwards, P.J., Lim, K., and Goh, K.K.T. 2022. Characterisation of de-structured starch and its shear-thickening mechanism. Food Hydrocolloids. 132: 107864. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107864
- Babu, A.S., and Parimalavalli, R. 2014. Effect of starch isolation method on properties of sweet potato starch. The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology, 38:48.
- Bahrami, M., Amiri, M.J., and Bagheri, F. 2019. Optimization of the lead removal from aqueous solution using two starch based adsorbents: Design of experiments using response surface methodology (RSM). Journal of Environmental Chemical Engineering. 7: 102793. doi: 10.1016/j.jece.2018.11.038
- Basiak, E., Lenart, A., and Debeaufort, F. 2017. Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. International Journal of Biological Macromolecules. 98: 348-356. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.122
- Bravo, A.F.V., and Chavarría, M.A. C. 2020. Extracción y caracterización del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Leona Blanca. Revista Ciencia y Tecnología El Higo. 10: 26-34.
- Calvache, M., Potosí, S., and Rodríguez, A. 2022. Sostenibilidad gastronómica: Aprovechamiento de subproductos derivados de cadena productiva de la papa variedad *Diacol Capiro*. Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales. 16: 389-397.
- Cao, M., and Gao, Q. 2020. Effect of dual modification with ultrasonic and electric field on potato starch. International Journal of Biological Macromolecules. 150: 637-643. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.00
- Chacón, W.D.C., Dos Santos Lima, K.T., Valencia, G.A., and Henao, A.C.A. 2020. Physicochemical properties of potato starch nanoparticles produced by anti-solvent precipitation. Starch-Stärke. 73: 2000086. doi:10.1002/star.202000086
- Chavez da Silva N.M., Cruz C.P.R., Druzian J.I., Fakhouri F.M., Lima F.R.L., and Cabral de Albuquerque E.C. 2017. PBAT/TPS Composite films reinforced with starch nanoparticles produced by ultrasound. International Journal of Polymer Science. 4308261. doi:10.1155/2017/4308261
- Chuiza-Rojas, M.R., Haro-Velasteguí, C.V., and Brito-Moína, H.L. 2021. Identificación de las variables de proceso óptimas para la producción del almidón de papa china (*Colocasia esculenta*). Dominio de las Ciencias. 7: 41. doi: 10.23857/dc.v7i1.1680
- Devaux, A., Goffart, J. P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V., and Hareau, G. 2021. The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable Agri-food Systems. Potato Research. 64: 681-720. doi: 10.1007/s11540-021-09501-4
- Dong, H., Chen, L., Zhang, Q., Gao, J., and Vasanthan, T. 2021. Optimization of processing parameters to produce nanoparticles prepared by rapid nanoprecipitation of pea starch. Food Hydrocolloids. 121: 106929. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106929
- Dupuis, J., and Liu, Q. 2019. Potato starch: A review of physicochemical, functional and nutritional properties. American Journal of Potato Association. 96: 127-138. doi: 10.1007/s12230-018-09696-2
- FAOSTAT. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics division. Recuperado de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/.02/11/2020>.
- García-Gurrola, A., Rincón, S., Escobar-Puentes, A.A., Zepeda, A., Francisco Pérez-Robles, J., and Martínez-Bustos, F. 2019. Synthesis and succinylation of starch nanoparticles by means of a single step using sonochemical energy. Ultrasonics Sonochemistry. 56: 458-465. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.035
- Genkina, N.K., Kozlov, S.S., Martirosyan, V.V., and Kiseleva, V.I. 2014. Thermal behavior of maize starches with different amylose/amylopectin ratio studied by DSC analysis. Starch - Stärke. 66: 700-706. doi:10.1002/star.201300220
- Gómez, A.F.P., and González-García, G. 2018. Síntesis y caracterización de un nuevo complejo hexacoordinado neutro de estaño (IV) con ligante O,N,N,O donador tipo salen. Jóvenes en la ciencia. 4:832-836.
- Gonçalves, I., Lopes, J., Barra, A., Hernández, D., Nunes, C., Kapusniak, K., Kapusniak, J., Evtyugin, D.V., Lopes, S.J.A., Ferreira, P., and Coimbra, M.A. 2020. Tailoring the surface properties and flexibility of starch-based films using oil and waxes recovered from potato chips byproducts. International Journal of Biological Macromolecules. 163: 251-259. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.231
- González-Cuello, R. E., Paternina, L., and Carrillo, A. 2016. Biopelículas terciarias: fuerza de ruptura y efecto sobre la vida útil de cortes de tilapia negra (*Oreochromis niloticus*). Información tecnológica. 27: 33-40. doi: 10.4067/S0718-07642016000100005
- Gui, Y., Zou, F., Zhu, Y., Li, J., Wang, N., Guo, L., and Cui, B. 2022. The structural, thermal, pasting and gel properties of the mixtures of enzyme-treated potato protein and potato starch. LWT. 154: 112882. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112882
- Guízar, M.A., Montañez, S.J.L., and García, R.I. 2008. Parcial caracterización de nuevos almidones obtenidos del tubérculo de camote del cerro (*Dioscorea* spp). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 9: 81-88.
- Haaj, S.B., Magnin, A., and Boufi, S. 2014. Starch nanoparticles produced via ultrasonication as a sustainable stabilizer in pickering emulsion polymerization. RSC Advances. 4: 42638-42646.

- Han, H., Hou, J., Yang, N., Zhang, Y., Chen, H., Zhang, Z., Shen, Y., Huang, S., and Guo, S. 2019. Insight on the changes of cassava and potato starch granules during gelatinization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 126, 37-43. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.201
- Hernández, J.E., Medina, O.J., Hernández, A.L., and Cocha, P.M. 2017. Oxidación y caracterización fisicoquímica de almidón de sagú "*Marantha Arundinacea*" para la elaboración de bioplástico. *Fuentes, el reventón energético*. 15: 19-26. doi: 10.18273/revfue.v15n1-2017002
- Hoover, R., and Ratnayake, W.S. 2001. Determination of total amylose content of starch. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. E2.3.1-E2.3.5. doi: 10.1002/0471142913.fae0203s00
- Huamani-H, A.L., Ponce-Ramírez, J.C., and Málaga-Juárez, J. 2020. Optimización del proceso de cocción de quinua utilizando el diseño 3k y la función de deseabilidad: Grado de gelatinización, índice de absorción de agua, índice de solubilidad y desprendimiento de cotiledones. *Scientia Agropecuaria*. 11: 381-390. doi: 10.17268/sci.agropecu.2020.03.10
- Jagadeesan, S., Govindaraju, I., and Mazumder, N. 2020. An insight into the ultrastructural and physicochemical characterization of potato starch: a review. *American Journal of Potato Research*. 97: 464-476. doi: 10.1007/s12230-020-09798-w
- Jaiswal, S., and Chibbar, R.N. 2017. Amylopectin small chain glucans form structure fingerprint that determines botanical origin of starch. *Carbohydrate Polymers*. 158: 112-123. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.059
- James, C.S. 1999. *Analytical Chemistry of Foods*. Second Edition, ASPEN Publishers. New York.
- Jeong, O., and Shin, M. 2018. Preparation and stability of resistant starch nanoparticles, using acid hydrolysis and cross-linking of waxy rice starch. *Food Chemistry*. 256: 77-84. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.098
- Ji, G., Luo, Z., Xiao, Z., and Peng, X. 2016. Synthesis of starch nanoparticles in a novel microemulsion with two ILS substituting two phases. *Journal of Materials Science*. 51: 7085-7092. doi: 10.1007/s10853-016-9952-1
- Jiménez-Villalba, K., Arrieta-Banquet, L., Salcedo-Mendoza, J., and Contreras-Lozano, K. 2019. Caracterización de harinas y almidones de batatas (*Ipomoea batatas* Lam.) de la costa caribe colombiana. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 22: e1185. doi: 10.31910/rudca.v22.n1.2019.1185
- Jiménez, H. L. G. 2022. Desarrollo, aplicaciones y desafíos de la nanomedicina. *Infodir*. e1216.
- Kirk, R.S., and Sawyer, R. 1991. *Pearson's Composition and Analysis of Food*. 9th Edition. Longman Scientific & Technical, England.
- Kowsik, P.V., and Mazumder, N. 2018. Structural and chemical characterization of rice and potato starch granules using microscopy and spectroscopy. *Microscopy Research and Technique*. 81: 1533-1540. doi: 10.1002/jemt.23160
- Kumar, Y., Singh, L., Sharanagat, V. S., Patel, A., and Kumar, K. 2020. Effect of microwave treatment (low power and varying time) on potato starch: Microstructure, thermo-functional, pasting and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 155: 27-35. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.17
- Lancheros, R.J., Beleño, J.A., Guerrero, C.A., and Godoy-Silva, R.D. 2014. Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*. 19: 161-168.
- Lemos, P.V.F., Barbosa, L.S., Ramos, I.G., Coelho, R.E., and Druzian, J.I. 2019. Characterization of amylose and amylopectin fractions separated from potato, banana, corn, and cassava starches. *International Journal of Biological Macromolecules*. 132: 32-42. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.086
- Li, C., Oh, S.G., Lee, D.H., Baik, H.W., and Chung, H.J. 2017. Effect of germination on the structures and physicochemical properties of starches from brown rice, oat, sorghum, and millet. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105: 931-939. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.123
- Li, J., Yang, N., Tang, J., Gui, Y., Zhu, Y., Guo, L., and Cui, B. 2022. The characterization of structural, thermal, pasting and gel properties of the blends of laccase-and tyrosinase-treated potato protein and starch. *LWT*. 153: 112463. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112463
- Li, Z., and Wei, C. 2020. Morphology, structure, properties and applications of starch ghost: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 163: 2084-2096. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.077
- Ma, Y., Zhao, H., Ma, Q., Cheng, D., Zhang, Y., Wang, W., Wang, J., and Sun, J. 2022. Development of chitosan/potato peel polyphenols nanoparticles driven extended-release antioxidant films based on potato starch. *Food Packaging and Shelf Life*. 31: 100793. doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100793
- Madera-Santana, T. J., Meléndrez, R., González-García, G., Quintana-Owen, P., and Pillai, S.D. 2016. Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of commercial poly(lactic acid) clamshell for food packaging. *Radiation Physics and Chemistry*. 123: 6-13. doi: 10.1016/j.radphyschem.2016.02.001
- Maniglia, B.C., Castanha, N., Le-Bail, P., Le-Bail, A., and Augusto, P.E. 2020. Starch modification through environmentally friendly alternatives: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 61: 2482-2505. doi: 10.1080/10408398.2020.1778633
- Martínez, J., Hernández, J., and Arias, A. 2017. Physicochemical and functional properties of white and brown rice (*Oryza sativa* L) starch. *Alimentos Hoy*. 25: 15-30.
- Martínez, P., Málaga, A., Betalleluz, I., Ibarz, A., and Velezmoro, C. 2015. Caracterización funcional de almidones nativos obtenidos de papas (*Solanum phureja*) nativas peruanas. *Scientia Agropecuaria*. 6: 291-301. doi: 10.17268/sci.agropecu.2015.04.06
- Martínez, P., Peña, F., Gómez, Y., Vargas, G., and Velezmoro, C. 2019a. Propiedades físicoquímicas, funcionales y estructurales de almidones nativos y acetilados obtenidos a partir de la papa (*Solanum tuberosum*) var. 'única'. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 85: 338-351.
- Martínez, P., Peña, F., Bello-Pérez, L. A., Núñez-Santiago, C., Yee-Madeira, H., and Velezmoro, C. 2019b. Physicochemical, functional and morphological characterization of starches isolated from three native potatoes of the Andean region. *Food chemistry: X*. 2: 100030. doi: 10.1016/j.fochx.2019.100030
- Meaño, C.N., Ciarfella, P.A.T., and Dorta, V.A.M. 2014. Evaluación de las propiedades químicas y funcionales del almidón nativo de ñame congo (*Dioscorea bulbifera* L.) para predecir sus posibles usos tecnológicos. *Saber*. 26: 182-188.

- Meaño, C.N., Ciarfella, P.A.T., and Dorta, V.A.M. 2016. Morphological characterization and viscoamulograph ic profile of native starch of Congo yam (*Dioscorea bulbifera* L.). *Saber*. 28: 250-256.
- Mejía, M.G., and Castellanos, S. J. A. 2018. Costos de producción y rentabilidad del cultivo de la papa en Zacapoaxtla, Puebla. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 9: 1651-1661. doi: 10.29312/remexca.v9i8.1721
- Moorthy, S.N. 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch-Stärke*. 54: 559-592. doi:10.1002/1521-379x(200212)54:12<559::aid-star2222559>3.0.co;2-f
- Morales, O.A.F. 2012. Fitogeografía e industrialización del almidón de pituca (*Colocasia esculenta*). *Espacio y Desarrollo*. 24: 97-117.
- Naderizadeh, S., Shakeri, A., Mahdavi, H., Nikfarjam, N., and Taheri Qazvini, N. 2018. Hybrid nanocomposite films of starch, poly (vinyl alcohol) (PVA), starch nanocrystals (SNCs), and montmorillonite (Na-MMT): Structure-properties relationship. *Starch – Stärke*. 1800027. doi: 10.1002/star.201800027
- Núñez-Santiago, M.C., García-Suárez, F.J., Gutierrez-Meraz, F., Sánchez-Rivera, M.M., and Bello-Pérez, L.A. 2011. Some intrinsic and extrinsic factors of acetylated starches: morphological, physicochemical and structural characteristics. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10: 501-512.
- NOM-F-68-S-1980. Alimentos Determinación de Proteínas. Recuperado de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980.09/11/2021.
- Olu-Owolabi, B.I., Afolabi, T.A., and Adebowale, K.O. 2011. Pasting, thermal, hydration, and functional properties of annealed and heat-moisture treated starch of sword bean (*Canavalia gladiata*). *International Journal of Food Properties*. 14: 157-174. doi: 10.1080/10942910903160331
- Ortega, J. G., and Hector, A. B. 2021. Estado de arte del cultivo de papa para el consumo de papa prefrita congelada (PPFC) en el Ecuador. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 25: 42-56. doi: 10.37066/ralap.v25i2.431
- Pardo, C.O.H., Castañeda, J.C., and Ortiz, C.A. 2013. Caracterización estructural y térmica de almidones provenientes de diferentes variedades de papa. *Acta Agronómica*. 62: 289-295.
- Piña-Barrera, A.M., Ramírez Pérez, M.S., Álvarez Román, R., Báez González, J.G., Amaya Guerra, C.A., and Galindo Rodríguez, S.A. 2021. Recubrimiento comestible a base de alginato en combinación con eugenol nanoencapsulado y su efecto conservador en la vida útil de jitomate (*Solanum lycopersicum*). *Biotecnía*. 23: 133-141. doi: 10.18633/biotecnía.v23i3.1477
- Quintero, M.L.P., Martínez, C.Y., Velasco, M.J.A., Arévalo, R.A., Muñoz, Y.A. and Urbina, S. N.A. 2015. Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista ION*. 28: 43-53.
- Ramírez, I.H., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C.A., Cortés, R.N.F., and Marín, M.L.R. 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de mezclas de almidón de papa y almidón de maíz ceroso. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*. 3. doi:10.29057/icap.v3i6.2447
- Rodríguez-Núñez, J.R., Madera-Santana, T.J., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., and Soto, V.H. 2014. Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment*. 22: 41-51. doi: 10.1007/s10924-013-0621-z
- Sana, S., Boodhoo, K., and Zivkovic, V. 2019. Production of starch nanoparticles through solvent-antisolvent precipitation in a spinning disc reactor. *Green Processing and Synthesis*. 8: 507-515. doi: 10.1515/gps-2019-0019
- Sánchez-Castelblanco, E. M., and Heredia-Martín, J. P. 2020. Evaluación de residuos de cáscaras de papa como sustrato para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 44: 794-804. doi: 10.18257/raccefyn.1122
- Sangokunle, O.O, Sathe, S.K., and Singh, P. 2020. Purified starches from 18 pulses have markedly different morphology, oil absorption and water absorption capacities, swelling power, and turbidity. *Starch-Stärke*. 72: 2000022. doi: 10.1002/star.202000022
- Sarifudin, A., Keeratiburana, T., Soontaranon, S., Tangsathitkulchai, C., and Tongta, S. 2020. Pore characteristics and structural properties of ethanol-treated starch in relation to water absorption capacity. *LWT*. 129: 109555. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109555
- Sattari, M., Fathi, M., Daei, M., Erfan-Niya, H., Barar, J., and Entezami, A.A. 2017. Thermoresponsive graphene oxide – starch micro/nanohydrogel composite as biocompatible drug delivery system. *BiolImpacts*. 7: 167-175. doi:10.15171/bi.2017.20
- Šimková, D., Lachman, J., Hamouz, K., and Vokál, B. 2013. Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorous content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food Chemistry*, 141: 3872-3880. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.080
- Sindhu, R., Devi, A., and Khatkar, B.S. 2019. Physicochemical, thermal and structural properties of heat moisture treated common buckwheat starches. *Journal of Food Science and Technology*. 56: 2480-2489. doi: 10.1007/s13197-019-03725-6
- Solarte-Montúfar, J.G., Díaz-Murangal, A.E., Osorio-Mora, O., and Mejía-España, D.F. 2019. Propiedades reológicas y funcionales del almidón de tres variedades de papa criolla. *Información Tecnológica*, 30: 35-44. doi: 10.4067/S0718-07642019000600035
- Šoltýs, A., Hronský, V., Šmídová, N., Olčák, D., Ivanič, F., and Chodák, I. 2019. Solid-state ¹H and ¹³C NMR of corn starch plasticized with glycerol and urea. *European Polymer Journal*. 117: 19-27. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.04.042
- Soto, D., and Oliva, H. 2012. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 32: 154-175.
- Thakur, M., Rai, A.K., Mishra, B.B., and Singh, S.P. 2021. Novel insight into valorization of potato peel biomass into type III resistant starch and maltooligosaccharide molecules. *Environmental Technology & Innovation*. 24: 101827. doi: 10.1016/j.eti.2021.101827

- Thérien-Aubin, H., Janvier, F., Baille, W.E., Zhu, X.X., and Marchessault, R. H. 2007. Study of hydration of cross-linked high amylose starch by solid state ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 342: 1525-1529. doi: 10.1016/j.carres.2007.04.014
- Too, B. C., Van, N., and Thuy, N. M. 2022. Formulation and quality evaluation of noodles with starchy flours containing high levels of resistant starch. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 21: 145-154. doi: 10.17306/J.AFS.2022.1011
- Torres, B.M., Carmona, G.R., and Aguirre, C.A. 2015. Obtención y caracterización estructural y funcional de almidón acetilado de malanga (*Colocasia esculenta* Schott). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6: 905-912.
- Torres, M. D., Fradinho, P., Rodríguez, P., Falqué, E., Santos, V., and Domínguez, H. 2020. Biorefinery concept for discarded potatoes: Recovery of starch and bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*. 275: 109886. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109886
- Valle, C.M., García, C.J., Laos, A. Doris., Yarasca, C. E., Loyola, G.E., and Surco-Laos, F. 2019. Análisis proximal y cuantificación de antocianinas totales en *Zea mays* variedad morada sometido a diferentes procesos de secado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 85: 109-115.
- Vargas, G., Martínez, P., and Velezmore, C. 2016. Propiedades funcionales de almidón de papa (*Solanum tuberosum*) y su modificación química por acetilación. *Scientia Agropecuaria*. 7: 223-230. doi: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.09
- Verma, R., Jan, S., Rani, S., Jan, K., Swer, T.L., Prakash, K.S., Dar, M.Z., and Bashir, K. 2018. Physicochemical and functional properties of gamma irradiated buckwheat and potato starch. *Radiation Physics and Chemistry*. 144: 37-42. doi: 10.1016/j.radphyschem.2017.11.009
- Yadav, U., Singh, N., Arora, S., and Arora, B. 2019. Physicochemical, pasting, and thermal properties of starches isolated from different adzuki bean (*Vigna angularis*) cultivars. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43: e14163. doi: 10.1111/jfpp.14163
- Zhang, H., He, F., Wang, T., and Chen, G. 2021. Thermal, pasting, and rheological properties of potato starch dual-treated with CaCl₂ and dry heat. *LWT*. 146: 111467. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111467
- Zhou, G., Luo, Z., and Fu, X. 2014. Preparation and characterization of starch nanoparticles in ionic liquid-in-oil microemulsions system. *Industrial Crops and Products*. 52: 105-110. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.019

Enterobacteriaceae in Pork Meat: Causal Agents of Public Health Problems

Enterobacterias en Carne de Cerdo: Agentes Causales de Problemas de Salud Pública

Alma D. Paz-González^{1,2}, Karina Vázquez¹, Ana V. Martínez-Vázquez², Carlos Ramírez- Martínez¹, Gildardo Rivera^{2*}

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, ZC 66054, México

² Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, ZC 88710, México.

SUMMARY

Pork meat is one of the most consumed products worldwide, and pathogenic microorganisms in pork, such as Enterobacteriaceae, represent a public health risk, causing *foodborne diseases*. Enterobacteriaceae in pork meat processing is an indicator of poor sanitation management. *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* spp. are the most prevalent bacteria. Different studies report that their high percentage and the multidrug resistance found are an alarming risk to consumers' health.

Keywords: Enterobacteriaceae, Pork, Public health.

RESUMEN

La carne de cerdo es uno de los productos más consumidos a nivel mundial, y los microorganismos patógenos en la carne de cerdo, como las Enterobacterias, representan un riesgo para la salud pública, provocando *enfermedades de transmisión alimentaria*. Las Enterobacterias en el procesamiento de la carne de cerdo son un indicador de una gestión sanitaria deficiente. *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella* spp. son las bacterias más prevalentes. Diferentes estudios indican que su porcentaje alto y la multifarmaco-resistencia son un riesgo alarmante para la salud de los consumidores.

Palabras clave: Enterobacterias, Carne de cerdo, Salud pública.

INTRODUCTION

Meat is one of the main food sources for the human population worldwide. It is an important source of protein, essential amino acids, zinc, iron, phosphorus, and vitamin B, providing benefits to adults (cell repair and regeneration) and children and adolescents (growth and development) (Bohrer, 2017). The consumption of meat is in high demand globally. However, consumption varies depending on the region due to the influence of various factors such as gender, rural or urban origin, educational level, and age of consumers (Estevez-Moreno *et al.*, 2021). Another important factor is income, which in the case of the Mexican population, is a determining aspect influencing the selection of chicken, pork, or beef meat (Huerta-Sanabria *et al.*, 2018).

The production and consumption of chicken, pork, beef, lamb, and mutton have grown, reaching record highs

in 2021, with an annual meat production and consumption of 335,275 and 334,975, respectively. Mexico is among the countries with the highest meat protein production and consumption. Chicken meat is the most consumed (4,166 tons), followed by pork (2,217 tons) and beef (1,723 tons) (OECD-FAO, 2022).

On the other hand, one of the world's biggest problems facing meat production and distribution is its susceptibility to bacterial contamination. This situation is related to deficiencies in hygiene and poor handling practices during processing and distribution, which cause public health problems such as gastroenteritis and diarrhea, among others. The Center for Disease Control and Prevention (CDC) reports more than 250 foodborne diseases (FBD), mainly caused by bacteria (CDC, 2021). Microbial spread in meat occurs during the slaughtering process, mainly Enterobacteriaceae, a large family of gram-negative bacteria, such as *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), and *Yersinia*, among others (Rönnqvist *et al.*, 2018; Peruzi *et al.*, 2021). Bacteria, such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Carnobacterium photobacterium* (*C. photobacterium*), *Listeria*, among others, have also been frequently detected in meat processing (Peruzi *et al.*, 2019).

Enterobacteriaceae cause FBD (Mladenović *et al.*, 2021), mainly gastrointestinal illnesses (Guzmán *et al.*, 2017). In recent years there has been infections with strains resistant to one or more antibiotics, which has complicated treatment, aggravating the disease, and even leading to the death of patients. For this reason, the World Health Organization (WHO) considers bacterial or multidrug resistance as one of the ten main health problems worldwide (WHO, 2019).

Different techniques have been established to detect Enterobacteriaceae, such as traditional microbiological methods involving bacterial colony counting and molecular techniques, such as the polymerase chain reaction (PCR), for rapid and more accurate detection (Cauchie *et al.*, 2020). Several studies have shown that Enterobacteriaceae are a recurrent problem in the production and commercialization of meat products, representing an important public health risk. Therefore, this study analyzed the presence of Enterobacteriaceae in pork meat and its potential risk as a causal agent of diseases.

*Correspondence author: Gildardo Rivera
 e-mail: gildardors@hotmail.com

Received: October 9, 2022

Accepted: February 2, 2023

We searched scientific articles in the PubMed, ScienceDirect, and Google Scholar databases for information and data on food safety issues in pork meat, regarding their production and consumption, bacterial pathogens presence, the prevalence of Enterobacteriaceae, and their impact on public health. The search was restricted to publications in English and Spanish. The literature review was carried out from March to July of 2022. The literature search was undertaken using the keywords: Enterobacteriaceae, meat, pork, antimicrobial resistance, and public health.

Prevalence of Enterobacteriaceae in pork meat

Several studies have demonstrated the presence of Enterobacteriaceae in pork meat samples (Table 1). In the United States, *E. coli* was detected with a prevalence of 12 % and *Salmonella* spp. with almost 6 % (Mollenkopf *et al.*, 2011); years later, *E. coli* was reported with a value of 18 % (Scheinberg *et al.*, 2017). While, in the northeast from Mexico, in the state of Tamaulipas, an investigation reported *E. coli* contamination in pork meat with a high prevalence (50 %) (Martínez *et al.*, 2018).

Salmonella spp. had a prevalence of 32 % in Romania (Mihaiu *et al.*, 2014), and 56 % (Arcos-Ávila *et al.*, 2013), and 71.4 % in Colombia (Rondón-Barragán *et al.*, 2015). *Salmonella* has been detected with a prevalence of 22 % in samples of ground pork in the central region from Mexico (Villalpando-Guzmán *et al.*, 2016). A recent study in southern Brazil detected *Salmonella enterica* (*S. enterica*) in this same type of meat with a prevalence of 17 % (Kich *et al.*, 2020). In contrast to these results, in Mexico city reported *Salmonella* spp. with a prevalence of only 2 % (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Antimicrobial resistance in pork meat

Due to the high manufacture and administration of antibiotics in the production process of livestock animals (in 2010,

more than 63,000 tons were used, and by 2030, more than 105,000 tons is estimated), antimicrobial resistance has rapidly increased and become a global public health threat (Van Boeckel *et al.*, 2015; Elshamy and Aboshanab, 2020).

The presence of antibiotic-resistant bacteria in pork meat is a serious problem. Bacterial strains with resistance to different groups of antibiotics are shown in Table 2. In Europe, *E. coli* and *Salmonella* strains multiresistant to β -lactams were detected in samples from a processing company in Germany, that was supplied by slaughterhouses from Poland, Belgium, and Spain. Therefore, the authors suggested that the cause of such resistance is due to a very extensive processing and distribution chain (Schill *et al.*, 2017). In Latin America, *E. coli* strains resistant to five antibiotics (ampicillin, tetracycline, nalidixic acid, chloramphenicol, and cotrimoxazole) were isolated in pork samples from markets in Lima, Peru (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018).

Impact on public health

According to WHO estimates, in 2015, FBD (caused by bacteria, viruses, parasites, toxins, and chemicals) triggered various outbreaks worldwide, sickening more than 600 million people annually and killing around 420,000. On the American continent, more than 77 million people fall ill annually, and around 9,000 die from consuming contaminated food. Among the food pathogens that endanger health, the Enterobacteriaceae responsible for diseases are mainly *Salmonella* (salmonellosis) and *E. coli*, which cause gastrointestinal problems such as nausea, vomiting, abdominal pain, and diarrhea. Other signs are fever and headache (WHO, 2018; Nastasijevic *et al.*, 2020).

Enterobacteriaceae infections from pork meat consumption represent a serious worldwide health problem for consumers. In the United States, chicken and pork meat consumption cause most salmonellosis infections (Bonardi,

Table 1. Prevalencia de Enterobacterias en carne de cerdo de diferentes países.

Table 1. Prevalence of Enterobacteriaceae in pork from different countries.

Bacteria	Prevalence (%)	Type of sample	Place of origin	Country
<i>E. coli</i>	12.2	Meat	Retail markets	United States (Mollenkopf <i>et al.</i> , 2011)
<i>Salmonella</i> spp.	5.8	Meat	Production and retail markets	Romania (Mihaiu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Salmonella</i> spp.	32.21	Meat	Slaughter	Colombia (Arcos-Ávila <i>et al.</i> , 2013)
<i>Salmonella</i> spp.	56.0	Meat	Slaughter	Colombia (Rondón-Barragán <i>et al.</i> , 2015)
<i>Salmonella</i> spp.	71.4	Meat	Slaughter	Mexico (Villalpando-Guzmán <i>et al.</i> , 2016)
<i>Salmonella</i> spp.	22.5	Ground beef	Retail markets	Mexico (Villalpando-Guzmán <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. coli</i>	18	Meat	Slaughter	United States (Scheinberg, 2017)
<i>E. coli</i>	50.8	Ground beef	Retail markets	Mexico (Martínez <i>et al.</i> , 2018)
<i>Salmonella</i> spp.	2.7	Tenderloin	Retail markets	Mexico (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Salmonella enterica</i>	17.2	Meat	Slaughter	Brazil (Kich <i>et al.</i> , 2020)

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana de Enterobacterias provenientes de carne de cerdo.

Table 2. Antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae from pork.

Bacteria	Resistant to	Country
E. coli	GEN, TGC, OFX, LEV.	Slovakia (Gajdošová <i>et al.</i> , 2011)
E. coli	AMC, AMP, PIP, CEC, COX, CXM, IMP, APR, GEN, NEO, SPT, STR, TOB, CMP, CIP, ENR, COL, DOX, CXT.	Germany (Schwaiger <i>et al.</i> , 2012)
E. coli Proteus vulgaris Klebsiella pneumoniae Enterobacter cloacae	AMP, PIP, CAZ, CXM, CTX.	Spain (Ojer-Usoz <i>et al.</i> , 2013)
Salmonella spp.	TET, FFC, AMP, CMP, AMC, EFT, STX, TMP, GEN, CIP.	Colombia (Bermúdez & Rincón 2014)
Salmonella spp.	SXT, STR, SPT, TET, AMP, TMP	Thailand (Sinwat <i>et al.</i> , 2015)
E. coli	AMP, AMC, CXT, CMP, STR, KAN, GEN, SXT, TMP, TET, CIP.	Czech Republic (Skočková <i>et al.</i> , 2015)
E. coli	CXT	Cuba (Marrero-Moreno <i>et al.</i> , 2017)
E. coli Escherichia fergusonii E. cloacae Proteus mirabilis P. vulgaris	GEN, CEP, CTX, CIP, AMP, CAZ, CMP. AMP CTX, CAZ, AMP. CEP, CTX, TGC, AMP, CMP, COL. CEP, TGC, AMP, CMP, COL.	Germany (Schill <i>et al.</i> , 2017)
E. coli	AMP, TET, NAL, CIP, CMP.	Peru (Ruiz-Roldán <i>et al.</i> , 2018)
E. coli	AMP, AMC, PIP, EPF, TET, GEN, TOB.	Thailand (Lugsomya <i>et al.</i> , 2018)

β-lactámicos: amoxicilina (AMC), ampicilina (AMP), piperacilina (PIP), cefaclor (CEC), cefoxitina (COX), cefuroxima (CXM), imipenem (IMP), cefotaxima (CXT), ceftiofur (EFT), cefalosporina (CEP). **Cloranfenicol:** cloranfenicol (CMP). **Aminoglicosidos:** apramicina (APR), gentamicina (GEN), neomicina (NEO), espectinomycin (SPT), estreptomycin (STR), tobramicina (TOB), kanamicina (KAN), florfenicol (FFC). **Fluoroquinolonas:** ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENR), doxiciclina (DOX). **Antimetabolitos:** sulfametoxazol (SXT), trimetoprima (TMP). **Tetraciclina:** tetraciclina (TET). **Quinolonas:** lovofoxacin (LEV), ofloxacin (OFX), ácido nalidixico (NAL). **Gliciliciclina:** tigeciclina (TGC). **Ureidopenicilinas:** ceftazidime (CAZ). **Polimixina:** colistina (COL).

β-lactams: amoxicillin (AMC), ampicillin (AMP), piperacillin (PIP), cefaclor (CEC), cefoxitin (COX), cefuroxime (CXM), imipenem (IMP), cefotaxime (CXT), ceftiofur (EFT), cephalosporin (CEP). **Chloramphenicol:** chloramphenicol (CMP). **Aminoglycosides:** apramycin (APR), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), spectinomycin (SPT), streptomycin (STR), tobramycin (TOB), kanamycin (KAN), florfenicol (FFC). **Fluoroquinolones:** ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), doxycycline (DOX). **Antimetabolites:** sulfamethoxazole (SXT), trimethoprim (TMP). **Tetracyclines:** tetracycline (TET). **Quinolones:** lovofoxacin (LEV), ofloxacin (OFX), nalidixic acid (NAL). **Glycylcycline:** tigecycline (TGC). **Ureidopenicillins:** ceftazidime (CAZ). **Polymyxin:** colistin (COL).

2017). According to Tran *et al.* (2018), *Salmonella enterica* (*S. enterica*) and some *E. coli* strains from pigs are major intestinal pathogens. In Germany, public health authorities investigated salmonellosis outbreaks in 2013 and 2014. Based on a trace-back analysis, they detected *Salmonella muenchen* (*S. muenchen*) in a pig breeding farm and considered it a probable source of contamination. The investigation suggested that intoxications were caused by consuming raw pork and pork products, traditional foods in some regions of Germany (Schielke *et al.*, 2017).

In The Netherlands, a study reported a strong association between salmonellosis and pork, considering that consuming pork contaminated with *Salmonella* increases the risk of intoxication in people treated with medications such as antibiotics or antacids. Additionally, salmonellosis contamination can also occur in workers from pig farms and slaughterhouses (Berends *et al.*, 1998).

An investigation by Hernandez *et al.* (2011) showed data on salmonellosis cases (paratyphoid and other salmonella-derived diseases) in Mexico from 2000-2008. In 2000, 10,000 cases were reported, although, in the same year, they began

to decrease; however, from 2002 to 2007, the cases increased to 12,000 and slightly decreased in 2008. In the case of shigellosis, by the end of 1999, there were 40,000 cases, with a significant decrease in the 2000-2008 period, reaching 10,000 cases; however, this number was still considered high according to those reported in the epidemiology bulletin of the Mexican Republic.

Good handling practices

Good handling practices and sanitary surveillance are important during the different stages of the production and distribution chain, to avoid pork meat contamination with bacterial pathogens harmful to humans (Tang *et al.*, 2017). Meat can be contaminated from its origin due to animal diseases, medication residues, or when the microbial flora of the slaughtered animal comes into contact with the meat. It can also be contaminated by surfaces, equipment, utensils, water, and even the hands of workers (Nerin *et al.*, 2016).

Slaughterhouses represent a strategic control point for achieving meat product safety (COFEPRIS, 2017, in Spanish). In the case of Mexico, the National Health, Safety and Food

Quality Service (SENASICA, in Spanish) and the Agriculture and Rural Development Secretariat (SADER, in Spanish), have as their objective the reduction in agricultural and livestock risks, among others, and to keep the surveillance of food contamination and agri-food quality of import and export products under strict control.

Breeding and animal care stage: At the start of pig breeding, feeding plays an important role in avoiding risks to animal and human health. In Mexico, the Official Mexican Standard, NOM-061-ZOO-1999, which states the "Animal health specifications of food products for human consumption", indicates which finished food products should be used for animal consumption. In the care of animals intended for human consumption, overexposure to antibiotics has potential adverse effects through direct toxicity to consumers and the generation of microbial resistance (Chen *et al.*, 2019). Due to the presence of antimicrobial-resistant bacteria, the use of antimicrobials for animal growth promotion was banned in Europe and the United States, particularly those classified as critically important for treating human infections (Iriti *et al.*, 2020). In Mexico, the specifications for the use of antibiotics in animals are described in the Official Mexican Standard NOM-064-ZOO-2000, "Guidelines for the classification and prescription of veterinary pharmaceutical products by the level of risk of their active ingredients." It establishes the technical and scientific criteria for the active ingredients used in the formulation of veterinary pharmaceutical products to avoid toxic effects on animals.

Slaughter and distribution stage: The pig slaughter process is commonly carried out in Federal Inspection Type (TIF, in Spanish) slaughterhouses, Health Secretariat Type (TSS, in Spanish) municipal slaughterhouses, or private slaughterhouses. TIF slaughterhouses are subject to stricter standards of hygiene regulation and cold chain integrity and are mainly used by large meat companies (OECD, 2018). However, the three slaughter sites must comply with the sanitary regulations for handling animal products stipulated in the NOM-194-SSA1-2004 standard, which has as its main objective the definition of the sanitary specifications that establishments must comply with if engaged in the slaughter and preparation of animals for supply, storage, transport, and sale of their products. In addition, meat product transportation and distribution chains must comply with NOM-024-ZOO-1995. This standard mentions the specifications and zoosanitary characteristics for the transportation of animals, their products, and by-products, and chemical, pharmaceutical, biological, and food products for use in animals or consumption by them. To this end, the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks (COFEPRIS, in Spanish) monitors the strategy for evaluating sanitary risks and management actions in slaughterhouses to reduce risks in meat products.

CONCLUSION

The increase in the worldwide production and consumption of pork meat in recent years have acquired greater relevance

for the food industry because the industry must provide food free of pathogenic microorganisms. Enterobacteriaceae are important because they spread easily and contaminate pork meat, causing gastrointestinal diseases. In this study, about the prevalence of Enterobacteriaceae in pork meat shown that *Salmonella* and *Escherichia* are frequently reported in slaughterhouses and retail markets. Unfortunately, both generous of strains are reported with antimicrobial resistance to several groups of antibiotics, such as β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, and chloramphenicol. Therefore, the responsible use of antibiotics in veterinary swine care practices should adhere to the provisions of good management practices manuals and current regulations aimed at the proper use of antibiotics during the raising of animals for human consumption.

REFERENCES

- Arcos-Ávila, E. C., Mora-Cardona, L., Fandiño-de Rubio, L. C., and Rondón-Barragán, I. S. 2013. Prevalencia de *Salmonella* spp. en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. Orinoquia. 17(1); 59-68.
- Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D. A. A., Burt, S. A., and Snijders, J. M. A. 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. International Journal of Food Microbiology. 44(3): 219-229.
- Bermúdez, P. M., and Rincón, S. M. 2014. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas del beneficio porcino en Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 32(1): 88-97.
- Bohrer, B. M. 2017. Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. Trends in Food Science & Technology. 65: 103-112.
- Bonardi, S. 2017. *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. Epidemiology & Infection. 145(8): 1513-1526.
- Cauchie, E., Delhalle, L., Taminiau, B., Tahiri, A., Korsak, N., Burteau, S., Fall, P. A., Farnir, F., Bare, G. and Daube, G. 2020. Assessment of spoilage bacterial communities in food wrap and modified atmospheres-packed minced pork meat samples by 16S rDNA metagenetic analysis. Frontiers in Microbiology. 10: 3074.
- Centro para el control y tratamiento de enfermedades (CDC). Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos. [Accessed July-10-2022] 2021. Available in: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- Chen, J., Zhao, L., Mao, Y., Ye, M., Guo, Q., Zhang, Y., Liyun, X., Zhang, Z., and Chu, H. 2019. Clinical efficacy and adverse effects of antibiotics used to treat *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. Frontiers in Microbiology. 10: 1977.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Riesgos en Alimentos de Origen Animal: Evaluación de Riesgos en Rastros y Mataderos Municipales. [Accessed May-19-2022] 2017. Available in: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/riesgos-en-alimentos-de-origen-animal-evaluacion-de-riesgos-en-rastrros-y-mataderos-municipales>
- Diario Oficial de la Federación. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, Especificaciones zoosanitarias de los

- productos alimenticios para consumo animal [Accessed June-20-2022]. 1994. Available in: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203496/NOM-061-ZOO-1999_11102000.pdf
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-024-ZOO-1995, Especificaciones y características zoonositarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. [Accessed July-01- 2022]. 1995. Available in: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/563482/NOM-024-ZOO-1995_161095.pdf
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000. Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. [Accessed June-25- 2022]. 2000. Available in: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203504/NOM-064-ZOO-2000_270103.pdf.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. [Accessed June- 30-2022]. 2004. Available in: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=661587&fecha=18/09/2004# gsc.tab=0
- Elshamy, A. A., and Aboshanab, K. M. 2020. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection, and treatment options. *Future science OA*. 6(3): FSO438.
- Estévez-Moreno, L. X., María, G. A., Sepúlveda, W. S., Villarroel, M., and Miranda-de la Lama, G. C. 2021. Attitudes of meat consumers in Mexico and Spain about farm animal welfare: A cross-cultural study. *Meat Science*. 173: 108377.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2021. Meat market review: Emergency trends and outlook. 1-15.
- Gajdošová, L., Kačániová, M., Bobček, B., Lejková, J., Hleba, L., and Čuboň, J. 2011. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae species isolated from pork meat. *Animal Physiology*. 57-62.
- Gutiérrez, R., Alquicira, E. P., Varela, D. B., and Chabela, M. D. L. P. 2020. Prevalencia de microorganismos patógenos en carne de cerdo al menudeo en supermercados de la Ciudad de México. *Nacameh*. 14(1): 31-40.
- Guzmán, C. A., Rodríguez-Rodríguez, V. C., and Calderón-Rangel, A. 2017. Contaminantes microbiológicos en un mercado del sur de Montería: Un riesgo para la salud pública. *Ciencia y Agricultura*. 14(2): 89-97.
- Hernandez, C. C., Aguilera, A. M. G., and Castro, E. G., C. E. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31(4): 137.
- Huerta-Sanabria, S., Arana-Coronado, Ó. A., Sagarnaga-Villegas, L. M., Matus-Gardea, J. A., and Brambila-Paz, J. D. J. 2018. Impacto del ingreso y carencias sociales sobre el consumo de carne en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9(6): 1245-1258.
- Iriti, M., Vitalini, S., and Varoni, E. M. 2020. Humans, animals, food and environment: One health approach against global antimicrobial resistance. *Antibiotics*. 9(6): 346.
- Kich, J. D., Souza, A. I., Montes, J., Meneguzzi, M., Costa, E. F., Coldebella, A., Corbellini, L. G. and Cardoso, M. 2020. Investigation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pig carcasses in Southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 40: 781-790.
- Lugsomya, K., Yindee, J., Niyomtham, W., Tribuddharat, C., Tummaruk, P., Hampson, D. J., and Prapasarakul, N. 2018. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from pigs and pork derived from farms either routinely using or not using in-feed antimicrobials. *Microbial Drug Resistance*. 24(7): 1054-1066.
- Marrero-Moreno, C. M., Mora-Llanes, M., Hernández-Fillor, R. E., Báez-Arias, M., García-Morey, T., and Espinosa-Castaño, I. 2017. Identificación de Enterobacteriaceae productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Revista de Salud Animal*. 39(3): 00-00.
- Martínez-Vázquez, A. V., Rivera-Sánchez, G., Lira-Méndez, K., Reyes-López, M. Á., and Bocanegra-García, V. 2018. Prevalence, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from retail meat in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 14: 266-272.
- Mihaiu, L., Lapusan, A., Tanasuica, R., Sobolu, R., Mihaiu, R., Oniga, O., and Mihaiu, M. 2014. First study of *Salmonella* in meat in Romania. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8(01): 050-058.
- Mladenović, K. G., Grujović, M. Ž., Kiš, M., Furmeg, S., Tkalec, V. J., Stefanović, O. D., and Kocić-Tanackov, S. D. 2021. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8615-8627.
- Mollenkopf, D. F., Kleinhenz, K. E., Funk, J. A., Gebreyes, W. A., and Wittum, T. E. 2011. *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* harboring bla CMY in retail beef and pork products. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(2): 333-336.
- Nastasijevic, I., Schmidt, J. W., Boskovic, M., Glisic, M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., and Bosilevac, J. M. 2020. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on pork carcasses for three steps of the harvest process at two commercial processing plants in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 87(1): e01711-20.
- Nerin, C., Aznar, M., and Carrizo, D. 2016. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*. 48: 63-68.
- Ojer-Usoz, E., González, D., Vitas, A. I., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles-Casquero, A., and de la Soledad Escolano, M. 2013. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science*. 93(2): 316-321.
- Organizacion para la cooperacion y el Desarrollo Económicos. Estudios de evaluación de competencia de la OCDE: Mexico. Editions OCDE, Paris. [Accessed March-02-2022]. 2018. Available in: <https://doi.org/10.1787/9789264287921-es>
- Organization for Economic Co-operation and Development-Food and Agriculture Organization (OECD-FAO) Agricultural Outlook 2017-2026: MEATS - OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026. [Accessed March-12-2022]. 2022. Available in: <https://stats.oecd.org/index.aspx?queryid=76854>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2017. Presentación y evaluación de los datos sobre residuos de plaguicidas para la estimación de los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Tercera edición. 225: 1-321.

- Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Cnockaert, M., Joossens, M., Proroga, Y. T. R., and Houf, K. 2019. Determination of the microbiological contamination in minced pork by culture dependent and 16S amplicon sequencing analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 290: 27-35.
- Peruzy, M. F., Houf, K., Joossens, M., Yu, Z., Proroga, Y. T. R., and Murru, N. 2021. Evaluation of microbial contamination of different pork carcass areas through culture-dependent and independent methods in small-scale slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*. 336: 108902.
- Rondón-Barragán, I. S., Arcos, E. C., Mora-Cardona, L., and Fandiño, C. 2015. Characterization of *Salmonella* species from pork meat in Tolima, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 28(1): 74-82.
- Rönnqvist, M., Välttilä, V., Ranta, J., and Tuominen, P. 2018. *Salmonella* risk to consumers via pork is related to the *Salmonella* prevalence in pig feed. *Food in Microbiology*. 71: 93-97.
- Ruiz-Roldán, L., Martínez-Puchol, S., Gomes, C., Palma, N., Riveros, M., Ocampo, K., Durand, D., Ochoa, T. J., Ruiz, J. and Pons, M. J. 2018. Presencia de Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 35: 425-432.
- Scheinberg, J. A., Dudley, E. G., Campbell, J., Roberts, B., DiMarzio, M., DebRoy, C., and Cutter, C. N. 2017. Prevalence and phylogenetic characterization of *Escherichia coli* and hygiene indicator bacteria isolated from leafy green produce, beef, and pork obtained from farmers' markets in Pennsylvania. *Journal of Food Protection*. 80(2): 237-244.
- Schielke, A., Rabsch, W., Prager, R., Simon, S., Fruth, A., Helling, R., Schnabel, M., Sifczyk, C., Wiczorek, S., Schroeder, S., Ahrens, B., Oppermann, H., Pfeiffer, S., Merbecks, S, S., Rosner, B., Frank, C., Weiser, A, A., Lubert, P., Gilsdorf, A., Stark, K. and Werber, D. 2017. Two consecutive large outbreaks of *Salmonella* Muenchen linked to pig farming in Germany, 2013 to 2014: Is something missing in our regulatory framework? *Eurosurveillance*. 22(18): 30528.
- Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G., and Reich, F. 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *International Journal of Food in Microbiology*. 257: 58-66.
- Schwaiger, K., Huther, S., Hölzel, C., Kämpf, P., and Bauer, J. 2012. Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology*. 154(3): 206-211.
- Sinwat, N., Angkittitrakul, S., and Chuanchuen, R. 2015. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from pork, chicken meat, and humans in Northeastern Thailand. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12(9): 759-765.
- Skočková, A., Koláčková, I., Bogdanovičová, K., and Karpíšková, R. 2015. Characteristic and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from retail meats purchased in the Czech Republic. *Food Control*. 47: 401-406.
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., and Ghali, W. A. 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*. 1(8): e316-e327.
- Tran, T. H. T., Everaert, N., and Bindelle, J. 2018. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 102(1): 17-32.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., and Laxminarayan, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(18): 5649-5654.
- Villalpando-Guzmán, S., Vázquez-Quiñones, C. R., Natividad-Bonifacio, I., Quiñones-Ramírez, E. I., and Vázquez-Salinas, C. 2016. Prevalence of *Salmonella* in Chicken, Beef and Pork Meat in Mexico City. *Academia Journal of Microbiology Research* 4(10): 125-130.
- World Health Organization (WHO). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. [Accessed April-18-2022] 2015. Available in: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- World Health Organization (WHO). *E. coli*. [Accessed April-15-2022] 2018. Available in: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- World Health Organization-Pan American Health Organization (WHO-OPS). [Accessed March-15-2022] 2019. Available in: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14916:ten-threats-to-global-health-in-2019&Itemid=135&lang=es



Mechanisms associated with endosperm modification in quality protein maize

Mecanismos asociados con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica

David Guillermo Gonzalez-Nuñez, Karen Virginia Pineda-Hidalgo, Nancy Yareli Salazar-Salas, Jose Angel Lopez-Valenzuela*

Faculty of Chemical-Biological Sciences, Autonomous University of Sinaloa, University City, Av. Americas y Josefa Ortiz de Dominguez S/N, CP 80010, Culiacan, Sinaloa, Mexico.; davidggn5@gmail.com, kvpineda@uas.edu.mx, nancy.salazar@uas.edu.mx, jalopezvla@uas.edu.mx

ABSTRACT

Quality protein maize (QPM) combines the protein quality of the *opaque-2* (*o2*) mutant with a vitreous endosperm. These characteristics have allowed breeding programs worldwide to produce QPM genotypes that help alleviate malnutrition of people in developing countries from Africa, Asia and Latin America with a cereal-based diet. However, the development of these materials has been inefficient due to the limited knowledge about the molecular basis of the soft *o2* endosperm conversion into a vitreous phenotype in QPM. This conversion has been associated with an increase in small protein bodies rich in 27 kDa γ -zein, the synthesis of starch with a higher proportion of amylose and short-intermediate amylopectin chain branches that favors the compaction of the starch granules, as well as alterations in the amyloplast envelope that favors the interaction between starch granules and protein bodies. Additional studies about the mechanisms involved in the modification of the endosperm in QPM will contribute to produce materials with good agronomic characteristics and protein quality.

Keywords: *Zea mays* L.; endosperm modification; starch; zeins

RESUMEN

El maíz de calidad proteínica (MCP) combina la calidad proteínica de la mutante *opaco-2* (*o2*) con un endospermo vítreo. Estas características han permitido a los programas de mejoramiento alrededor del mundo producir genotipos MCP que ayudan a aliviar la malnutrición de la gente en países en desarrollo de África, Asia y América Latina con una dieta basada en cereales. Sin embargo, el desarrollo de estos materiales ha sido poco eficiente debido al limitado conocimiento acerca de las bases moleculares de la conversión del endospermo suave *o2* en un fenotipo vítreo en MCP. Esta conversión se ha asociado con el incremento en cuerpos proteínicos pequeños ricos en γ -zeína de 27 kDa, la síntesis de almidón con una mayor proporción de amilosa y ramificaciones de amilopectina cortas-intermedias que favorece la compactación de los gránulos de almidón, así como alteraciones en la envoltura de los amiloplastos que favorece

la interacción entre gránulos de almidón y cuerpos proteínicos. Estudios adicionales sobre los mecanismos involucrados en la modificación del endospermo en MCP contribuirán a producir materiales con buenas características agronómicas y buena calidad proteínica.

Palabras clave: *Zea mays* L., modificación del endospermo, almidón, zeínas

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is the most important cereal with a global production of 1,162 million tons in 2020 (FAOSTAT, 2022). This cereal has a great social impact in developing countries where it is the main food staple. However, the most abundant proteins of maize (prolamins or zeins) are deficient in the essential amino acids lysine and tryptophan affecting the nutritional quality of the grain.

Mertz *et al.* (1964) found that the *opaque-2* (*o2*) mutation (Figure 1) almost doubles the lysine content in maize endosperm and improves the protein quality, but the use of this mutant in breeding programs was limited due to its poor agronomic performance associated with the opaque/soft endosperm and low seed density. Some years later, Paez *et al.* (1969) found that some segregating S_2 lines derived from opaque S_1 parents showed modified *o2* kernels (50% translucent or vitreous) whose lysine content was not different from the opaque kernels. Therefore, selection for hard endosperm was started. Researchers from the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) in Mexico (Villegas *et al.*, 1992) and the University of Natal in South Africa (Gevers and Lake, 1992), developed a modified *o2* mutant or quality protein maize (QPM) (Figure 1) by recurrent backcrossing. This process required the simultaneous selection of kernels with normal texture and enhanced levels of essential amino acids. Thus, QPM combines the protein quality of *o2* with a vitreous endosperm and has better agronomic characteristics.

The QPM materials developed by the CIMMYT maize breeding program have been used worldwide as donors of *o2* modifiers to produce lines and hybrids adapted to each region. However, conventional QPM breeding involves the introgression of *o2* into a local adapted genotype that is sub-

*Corresponding author: Jose A. Lopez Valenzuela
 e-mail: jalopezvla@uas.edu.mx

Received: December 1, 2022

Accepted: February 5, 2023

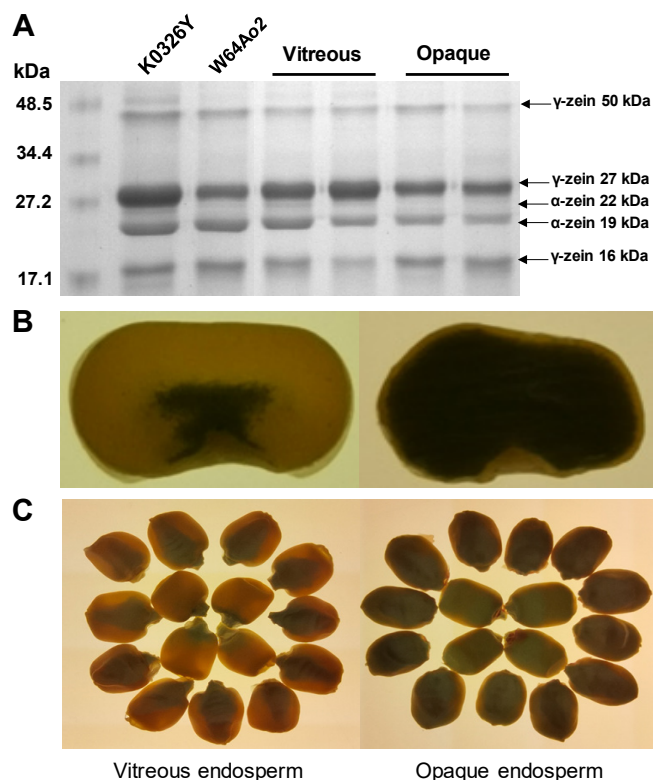


Figure 1. Zein profiles and endosperm phenotype of vitreous (QPM) and opaque maize genotypes. (A) SDS-PAGE separation of zein proteins. The molecular weight marker (kDa) is shown on the left and the different zein sub-fractions are indicated on the right. A greater abundance of 27-kDa γ -zein can be observed in the endosperm of vitreous lines compared to the opaque ones. Adapted from Vega-Alvarez *et al.* (2022). (B) Cross section of K0326Y (vitreous) and W64Ao2 (opaque) maize kernels viewed under white light. (C) Whole grains of K0326Y (vitreous) and W64Ao2 (opaque) maize viewed under white light.

Figura 1. Perfiles de zeínas y fenotipo del endospermo en genotipos de maíz vítreos (QPM) y opacos. (A) Separación por SDS-PAGE de proteínas zeínas. El marcador de peso molecular (kDa) se muestra a la izquierda y las diferentes subfracciones de zeínas se indican a la derecha. Se puede observar una mayor abundancia de γ -zeína 27 kDa en el endospermo de líneas vítreas comparado con las opacas. Adaptado de Vega-Alvarez *et al.* (2022). (B) Sección transversal de granos de maíz de las líneas K0326Y (vítrea) y W64Ao2 (opaca) vistos bajo luz blanca. (C) Granos enteros de maíz de las líneas K0326Y (vítrea) y W64Ao2 (opaca) vistos bajo luz blanca.

sequently used to pollinate a modifier donor, a process that requires several generations of backcrossing and self-crossing and the monitoring of high levels of lysine and tryptophan, the recessive *o2* mutant allele, and the modifiers. This lengthy and laborious strategy can take more than six years. The use of molecular markers has facilitated QPM breeding but this process could be more efficient if the mechanisms involved in the conversion of the soft *o2* endosperm into a vitreous phenotype were understood (Gibbon and Larkins, 2005). The main mechanisms proposed for this conversion include an increase in the accumulation of small protein bodies enriched in 27 kDa γ -zein (Wu *et al.*, 2010), the alteration of the structure and composition of starch due to the increase in the proportion of amylose and short-intermediate amylopectin chain branches (Gibbon *et al.*, 2003; Salazar-Salas *et al.*, 2014) and the loss of the amyloplast envelope due to a reduction

in non-polar carotenoids (Wang *et al.*, 2020). The aim of the present review is to provide the current advances about the molecular mechanisms associated with the modification of the vitreous endosperm in QPM.

MAIZE KERNEL COMPOSITION

The major components of the maize kernel are starch (64 - 78 %) and proteins (8 - 15 %). Starch is mainly found in the endosperm while proteins are more abundant in the germ. The remaining components of the grain consist of lipids (4.0 - 4.9 %), ashes (1 - 3 %) and fiber (1 - 2 %) (Serna-Saldivar, 2019). Starch and proteins influence the physicochemical and structural characteristics of the kernel, highlighting the importance of these components.

Starch biosynthesis

Starch is the main carbon reserve in cereals (70 - 80 %) and is mainly responsible for their energetic and economic value. It is formed by two homopolysaccharides: amylose, an essentially linear molecule formed by glucose units linked by α -(1,4) glycosidic bonds, and amylopectin, a molecule formed by linear portions of glucose linked by α -(1,4) glycosidic bonds and ramifications linked by α -(1,6) bonds (Pfister and Zeeman, 2016).

In cereals, starch is mainly found in endosperm cells forming granules and its biosynthesis is carried out by the coordinated action of multiple enzymes: ADP-Glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch synthases (GBSS, SS), starch branching enzymes (SBE) and starch debranching enzymes (DBE) (Figure 2) (Comparot-Moss and Denyer, 2009). This process begins with the enzyme AGPase that produces ADP-glucose in the cytosol, which is transported into the plastid and serves as a substrate for starch synthase enzymes (Pfister and Zeeman, 2016). The granule bound starch synthase I (GBSSI) is encoded by the *waxy* locus in cereals and is responsible for the elongation of amylose, being essential within the granule matrix. The soluble starch synthases (SSI, SSII, SSIII and SSIV) are exclusively involved in the synthesis of amylopectin chains and are associated with the starch granules. Genetic and biochemical studies indicate that each SS isoform has different properties and a different role in amylopectin synthesis. The starch branching enzyme (SBE) generates α -(1,6) glycosidic bonds after breaking the α -(1,4) bond and transferring the chain to the C6 from a glucose residue of another chain, forming the branched structure of the amylopectin molecule (Huang *et al.*, 2021). Two isoforms of branching enzymes are expressed in the endosperm of cereals, branching enzyme I (SBEI) and branching enzyme II (SBEII), which differ in the length of the transferred glucan chain and substrate specificity; SBEI shows greater affinity for amylose and transfers longer chains than SBEII, which transfers shorter chains and has greater affinity for amylopectin (Sawada *et al.*, 2018).

The starch debranching enzyme (DBE) catalyzes the hydrolysis of glycosidic bonds α -(1,6). In higher plants the-

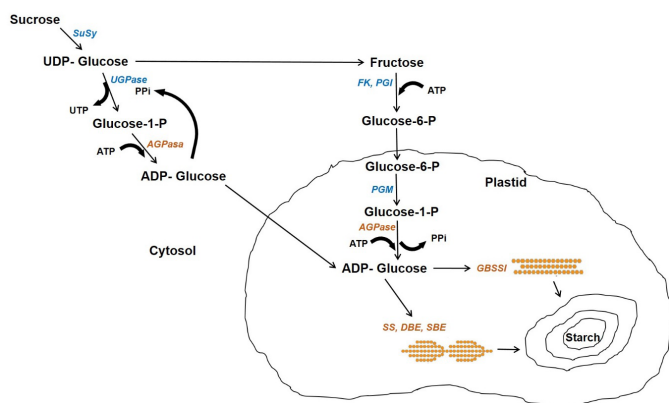


Figure 2. Starch biosynthesis pathway in the endosperm of cereals. The cytosol and plastid are indicated. Enzymes are indicated in italics: Susy, sucrose synthase; UGPase, UDP glucose pyrophosphorylase; PGM, phosphoglucomutase; FK, fructokinase; PGI, phosphogluco isomerase; PPiase, pyrophosphatase; AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; GBSSI, granule bound starch synthase; SS, starch synthase; SBE, starch branching enzyme. Adapted from Comparot-Moss and Denyer (2009).

Figura 2. Ruta de síntesis de almidón en el endospermo de cereales. Se indican el citosol y el plástido. Las enzimas están indicadas en *itálicas*: Susy, sacarosa sintasa; UGPasa, UDP glucosa pirofosforilasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; GBSSI, almidón sintasa unida al gránulo; SS, almidón sintasa; SBE, enzima ramificadora de almidón. Adaptada de Comparot-Moss and Denyer (2009).

re are two types of DBE and they are defined according to the specificity of their substrate: debranching enzymes of the isoamylase type and the pullulanase type. Isoamylase breaks down amylopectin and phytoglycogen branches, while pullulanase acts on pullulans and amylopectin but not phytoglycogen (Robyt, 2009).

Synthesis of zeins

The most abundant storage proteins in maize kernels are prolamins (soluble in alcohol) or zeins (50-55%), followed by glutelins (soluble in alkaline solutions) (35-40%), while albumins (soluble in water) and globulins (soluble in saline solutions) account for less than 10% of the total proteins (Larkins, 2019; Sethi *et al.*, 2021). Because zeins are the major proteins in the kernel, total proteins are typically divided into zeins and non-zeins. Zeins are synthesized by membrane-delimited polyribosomes and transported within the lumen of the rough endoplasmic reticulum, where they assemble into protein bodies (Lending and Larkins, 1989). Protein bodies are small spherical structures made up of a protein matrix surrounded by a simple membrane; they contain at least four types of zeins (α -, β -, γ -, δ -), which are classified based on their solubility and structural similarities as α -zeins (22 and 19 kDa), β -zeins (14 and 16 kDa), γ -zeins (16, 27 and 50 kDa) and δ -zeins (10 kDa) (Figure 1A) (Coleman and Larkins, 1999). Immunolocalization studies showed that γ - and β -zeins are generally located in the peripheral region of protein bodies, while α -zeins are located in the internal region of these structures (Lending and Larkins, 1989).

The $\alpha 2$ mutant has a defective transcription factor that regulates the expression of α -zeins and depending on the genetic background the content of these proteins can be

reduced more than 50% (Figure 1A) (Kodrzycki *et al.*, 1989). Zeins are deficient in some essential amino acids (lysine and tryptophan) and the reduced synthesis of these proteins in $\alpha 2$ results in higher levels of more nutritionally balanced non-zeins (Lopez-Valenzuela *et al.*, 2004) and free amino acids in the endosperm (Pineda-Hidalgo *et al.*, 2011). The use of RNA interference (RNAi) to block the expression of α -zeins has also shown to increase the levels of lysine and tryptophan in maize endosperm (Huang *et al.*, 2006), which avoids the negative characteristics and limitations of the recessive $\alpha 2$ mutant. The Cas9/CRISPR technology represents another biotechnological alternative to reduce or remove zein gene expression as a strategy to increase the levels of proteins with a better balance of essential amino acids (Jiang *et al.*, 2022).

QUALITY PROTEIN MAIZE AND ITS IMPORTANCE IN HUMAN NUTRITION

Malnutrition is a problem that affects more than 828 million people worldwide, 98% of which are from developing countries, mainly Africa, Asia, Latin America and the Caribbean, and includes 150 million children (FAOSTAT, 2022). People from developing countries with a cereal-based diet have a high risk of protein and lysine deficiency (Muleya *et al.*, 2022), although this deficiency can occur in any people with a diet based on cereals. Several investigations have documented the benefits of QPM in human nutrition, highlighting its potential to mitigate problems associated with protein-energy deficiency in children under 5 years of age, the elderly and pregnant women, considered the most vulnerable groups (Hossain *et al.*, 2019).

The consumption of QPM instead of normal maize, increased 12 - 15% the weight growth rate in infants and young children, with mild to moderate undernutrition (Akalu *et al.*, 2010; Gunaratna *et al.*, 2010). QPM has also a higher content of phenylalanine and isoleucine, suggesting it can be included in the family diet to reduce the risk of inadequate protein intake (Gunaratna *et al.*, 2019). Tortillas from nixtamalized and extruded QPM flours showed higher nutritional indicators (C-PER, protein digestibility, PER, NPR, PDCAAS) than those from normal maize, suggesting they may have a positive effect on the nutritional status of people from countries where these products are widely consumed (Gutiérrez-Dorado *et al.*, 2008). Desalegn *et al.* (2015) showed that QPM based complementary foods have good sensory acceptability and can help meet the minimum recommended daily dose of energy (370 kcal) and protein (10.9 g) for children aged 6 - 36 months, as well as two thirds of the recommended iron and zinc daily dose and up to 50 % of vitamin A. The supplementation of malnourished young children (4 - 6 years old) with QPM-based biscuits reduced the percentage of anemic subjects from 63.3 % to 16.6 % and the prevalence of severe underweight from 23.3 % to 0 % (Grover *et al.*, 2020).

In recognition of the great potential of QPM to improve human nutrition in poor countries where maize is a staple food, Dr. Surinder K. Vasal and Dr. Evangelina Villegas from

CIMMYT were awarded with the World Food Prize in 2000 (Cordova, 2001).

ADVANCES IN THE DEVELOPMENT OF QPM

Despite the QPM nutritional value and agronomic performance, the cultivation and adoption of these materials on a large scale has not been achieved, mainly due to the low availability of genetically diverse and competitive QPM hybrids compared to non-QPM / normal hybrids, the lack of information about their health benefits and government incentives (Hossain *et al.*, 2018; Maqbool *et al.*, 2021). Nevertheless, breeding programs have been implemented around the world with the purpose of producing new and better QPM genotypes; they have mainly used QPM donors from CIMMYT in Mexico (Cordova, 2001; Vivek *et al.*, 2008). Until 2015, more than 167 QPM varieties were released worldwide, 53 % in Africa, 25 % in Latin America and 22 % in Asia (Twumasi-Afryie *et al.*, 2016). Some of these QPM genotypes are listed in Table 1. Conventional breeding strategies such as recurrent selection were initially used for QPM development, but in the last decades a widely used strategy to develop these materials is molecular marker-assisted breeding and most of the studies have used SSR markers (*e.g.* phi 057, phi 112 and umc 1066) located within the *o2* gene on the short arm of chromosome 7 (www.maizegdb.org) (Maqbool *et al.*, 2021). Some examples include the QPM version of the line V25 derived from the cross V25 × CML176 (QPM), which shows an increase in tryptophan content (0.85 %) and maintains a hard endosperm (Babu *et al.*, 2005), as well as Vivek QPM-9 (VQL 1 × VQL 2) that contains 41 % more tryptophan and 30 % more lysine than the original hybrid (Vivek Hybrid-9) (Table 1) (Gupta *et al.*, 2013).

Other researchers have focused on developing new QPM genotypes with certain agronomic and gastronomic characteristics, but always seeking to maintain the nutritional quality of *o2*. For instance, the Zhao OP-6 /*o2o2* corn was generated by introducing the *o2* allele into the Zhao OP-6 waxy corn to produce a waxy QPM line intended for the Chinese market, where waxy corn is widely used in food processing because of its high viscosity and digestibility (Zhou *et al.*, 2016). Quality Protein Popcorn (QPP) was developed recently, which showed a higher lysine content compared to its parent elite line and maintained its bursting capacity, demonstrating the potential use of QPM for the production of grains with specific functional characteristics and good protein quality (Ren *et al.*, 2018). Since most of the efforts to develop QPM have been based on the use of molecular markers that co-inherit with the *o2* phenotype, improving the understanding of the molecular basis of endosperm modification could help to develop these materials more efficiently.

MECHANISMS ASSOCIATED WITH ENDOSPERM MODIFICATION IN QPM

Increased accumulation of γ -zein proteins

One of the first biochemical changes observed in QPM genotypes was an increase in γ -zein content (2 to 5 times) compared to *o2* (Figure 1A) and normal maize (Wallace *et al.*,

1990). Immunolocalization studies suggested that γ -zein initiates the formation of protein bodies (Lending and Larkins, 1989), which is supported by the fact that inhibition of the 27 kDa γ -zein encoding gene reduces significantly the number of protein bodies, while the inhibition of 19 and 22 kDa α -zeins decreases the diameter of these structures (Guo *et al.*, 2013). The γ -zeins are highly linked with disulfide bonds and it has been hypothesized that the covalent bonds of γ -zeins and other cysteine rich proteins promote the formation of a protein network around starch granules (Lopes and Larkins, 1991). Therefore, it has been proposed that an increase in the number of protein bodies and their compaction among the starch granules is, at least partially, responsible for the modification of the endosperm (Figure 3A). A genetic analysis using recombinant inbred lines (RIL) derived from the cross of Pool 33 (QPM) and W64Ao2 (soft endosperm), identified two *loci* associated with endosperm modification; these *loci* were located on the long arm of chromosome 7, one near the centromere linked to a 27 kDa γ -zein *locus* and the other near the telomere (Lopes *et al.*, 1995). Holding *et al.* (2008) identified 7 *loci* associated with *o2* modifier genes (*mo2*) in an F2 progeny from the cross of K0326Y-QPM and W64Ao2; two major *loci* located on chromosomes 7 and 9 explained 40 % of the phenotypic variation and were linked to 27 kDa γ -zein and starch synthesis genes, respectively. Holding *et al.* (2011) developed RIL from the F2 progeny and the kernels were characterized for vitreousness, density and hardness; genetic mapping with these RIL identified *loci* on chromosomes 1, 7 and 9, confirming their linkage with γ -zein and starch biosynthesis genes.

Several studies have focused on the 27 kDa γ -zein locus to understand the mechanism of *o2* modifier genes. There is more than one gene for 27 kDa γ -zein in this *locus*, which are assigned depending on the genotype and are called A and B, and together form the AB *locus* (Das *et al.*, 1990). The AB locus of γ -zeins is not stable and can be rearranged to form A and B, called *rA* and *rB*, respectively (Das *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1991). Because all known QPM lines contain the A and B genes, and all F2 progeny from a cross of a QPM and an *o2* mutant contain the AB locus, it has been hypothesized that the AB locus is necessary for endosperm modification, although it is also emphasized that this locus by itself is not sufficient to achieve such modification (Lopes *et al.*, 1995).

Although the molecular mechanism of the *mo2* genes is not fully understood, evidence suggests that a greater stability of the γ -zein mRNA and/or a higher transcription rate may be responsible for a larger accumulation of the 27 kDa γ -zein protein in modified *o2* genotypes. Geetha *et al.* (1991) suggested that the role of *mo2* genes is to increase the stability of γ -zein mRNA and protein synthesis. Or *et al.* (1993) suggested that the stability of the A gene mRNA initiates enhanced 27 kDa γ -zein protein synthesis. Burnett and Larkins (1999) found that the A:B ratio of γ -zein mRNA in *mo2* endosperms was more than 40:1, compared to a 1:1 ratio for normal maize and 3:1 for *o2*, indicating that these relationships can result from different transcription rates of the genes A and B.

Table 1. Development of QPM genotypes.**Tabla 2.** Desarrollo de genotipos QPM.

Name	Pedigree/Background	Gene(s) introgressed	Country	Reference
NB-Nutrinta (OPV)	Poza Rica 8763	<i>o2</i>	Nicaragua	Cordova (2001)
HQ INTA-993 (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Nicaragua	Cordova (2001)
HB-PROTICTA (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Guatemala	
HQ-61 (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	El Salvador	
HQ-31 (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Honduras	
ICA- (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Colombia	
FONAIAP (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Venezuela	
BR-473, BR-451 (OPV)		<i>o2</i>	Brazil	
INIA- (hybrid)	CML161 × CML165	<i>o2</i>	Peru	Cordova (2001)
HQ-2000 (hybrid)	CML161 × CML165	<i>o2</i>	Vietnam	Cordova (2001)
Zhongdan 9409 (hybrid)	Pool 33 × Temp QPM	<i>o2</i>	China	Cordova (2001)
QUIAN2609 (hybrid)	Tai 19/02 × CML171	<i>o2</i>	China	Cordova (2001)
Susuma (OPV)	Across 8363SR		Mozambique, Senegal	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
Longe-5 'Nalongo' (OPV)	Across 8363SR		Uganda	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
Obatanpa (OPV)	Across 8363SR		Benin, Burkina Faso, Cameroon, Cote d'Ivoire, Ghana, Guinea, Malawi, Mali, Nigeria, Senegal, South Africa, Togo	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
Lishe-K1(OPV)	Across 8363SR		Tanzania	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
EV 99 QPM (OPV)			Cote d'Ivoire, Nigeria, Senegal, Togo	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
KH500Q (hybrid)	(CML144 × CML159) CML181	<i>o2</i>	Kenya	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
BHQP542 (hybrid)	(CML144 × CML159) CML176	<i>o2</i>	Ethiopia	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
MHQ138 (hybrid)	(CML144 × CML159) Pool15Q	<i>o2</i>	Ethiopia	Jilo (2022)
BHQPY545 (hybrid)	CML181 × CML165	<i>o2</i>	Ethiopia	Jilo (2022)
QS-7705 (hybrid)		<i>o2</i>	South Africa	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
GH-132-28 (hybrid)	P62, P63	<i>o2</i>	Ghana	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
ZS261Q (hybrid)	(CZL01006 × CML176) × (CZL01005 × CML181)	<i>o2</i>	Zimbabwe	Krivanek <i>et al.</i> (2007)
441C (hybrid)	CML142 × CML116	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
H-551C (hybrid)	CML142 × CML150	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
H-553C (hybrid)	(CML142 × CML150) CML176	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
H-519C (hybrid)	(CML144 × CML159) CML170	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
H-368EC (hybrid)	CML186 × CML149	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
H-369EC (hybrid)	CML176 × CML186	<i>o2</i>	Mexico	Cordova (2001)
V-537C (OPV)	Poza Rica 8763	<i>o2</i>	Mexico	Gómez-M <i>et al.</i> (2003)
V-538C (OPV)	Across 8762			
H-374C (hybrid)	(CML176 × CML142) CML186	<i>o2</i>	Mexico	Noriega González <i>et al.</i> (2011)
H-564C (hybrid)	(LT158 × LT159) LT160	<i>o2</i>	Mexico	Sierra Macías <i>et al.</i> (2011)
V556AC (OPV)		<i>o2</i>	Mexico	Twumasi-Afriyie <i>et al.</i> (2016)
ZAPATA 3		<i>o2</i>	Mexico	Twumasi-Afriyie <i>et al.</i> (2016)
ZAPATA 9		<i>o2</i>	Mexico	Twumasi-Afriyie <i>et al.</i> (2016)
V25 QPM (line)	V25 × CML176	<i>o2</i>	India	Babu <i>et al.</i> (2005)
Vivek QPM-9 (hybrid)	VQL1 (CM212 × CML180) × VQL2 (CM145 × CML170)	<i>o2</i>	India	Gupta <i>et al.</i> (2009); Gupta <i>et al.</i> (2013)

Name	Pedigree/Background	Gene(s) introgressed	Country	Reference
BC2F4-1 (line)	QCL3024 (<i>o16</i>) × QCL5019 (<i>wx</i>) and QCL5008 (<i>wx</i>)	<i>o16</i>	China	Yang <i>et al.</i> (2013)
BQPM9 (line)	(B99 × CLQ 06901) B99			
BQPM10 (line)	(B99 × CLRQ 00502) B99			
BQPM11 (line)	(B100 × CLQ 06901) B100			
BQPM12, BQPM16 (line)	(CLQ 06901 × B98) B98	<i>o2</i>	USA	Worral <i>et al.</i> (2015)
BQPM13, BQPM14 (line)	(CLQ 06901 × B97) B97			
BQPM15 (line)	(B91 × CLQ 06901) B91			
BQPM17 (line)	(CLQ 06901 × B113) B113			
ZPL 3 QPM (line)	ZPL 3 × CML144	<i>o2</i>	Serbia	Kostadinovic <i>et al.</i> (2016)
ZPL 5 QPM (line)	ZPL5 × CML144			
Zhao OP-6/ <i>o2o2</i> (line)	Zhao OP-6 × QPM CA339 (pool33)	<i>o2</i>	China	Zhou <i>et al.</i> (2016)
BML-7 QPM (line)	BML-7 × CML-186	<i>o2</i>	India	Krishna <i>et al.</i> (2017)
CBML6 QPM (line)	BML6 × CML181			
CBML7 QPM (line)	BML7 × CML181	<i>o2</i>	India	Surender <i>et al.</i> (2017)
DHM117 (hybrid)	CBML6 × CBML7			
HM4 QPM (line)	HK1323 × HK1161			
HM8 QPM (line)	HK11105 × CML161	<i>o2</i>	India	Hossain <i>et al.</i> (2018)
HM9 QPM (line)	HK11128 × HK1193-1			
V238AC (OPV)	Comiteco race (yellow) × CML-172	<i>o2</i>	Mexico	Coutiño Estrada and Vázquez Carrillo (2018)
Quality Protein Popcorn (QPP) (lines)	CML154Q × (P2, P3, P9) Tx807 × P2 K0326Y × (P3, P7)	<i>o2</i>	USA	Ren <i>et al.</i> (2018)
QCL8006-1 (line) QCL8006-2 (line)	QCL3024 (<i>o16</i>) × Taixi19 (<i>o2</i>) and QCL5019 (<i>wx</i>)	<i>o2/o16</i>	China	Wang <i>et al.</i> (2019)
HM5-A (hybrid)	(HK11344 × PMI-102- <i>o2o16</i>) × (HK11348-6-2 × PMI-102- <i>o2o16</i>)	<i>o2/o16</i>	India	Chand <i>et al.</i> (2022)
HM12-B (hybrid)	(HK11344 × PMI-102- <i>o2o16</i>) × HK11378 × PMI-102- <i>o2o16</i>)			
V56AC (OPV)	Oloton race (yellow) × CML-172	<i>o2</i>	Mexico	Coutiño Estrada <i>et al.</i> (2022)

OPV: Open pollinated variety.

These results are consistent with a model in which the two *loci* associated with *mo2* genes influence the expression of γ -zein genes through different mechanisms: one affects the transcription of the γ -zein *locus* and the other influences the stability of the γ -zein RNA. Holding *et al.* (2011) evaluated the expression in developing endosperm (18 days after pollination, DAP) of QPM lines contrasting in vitreousness, reporting a higher expression of the 27 kDa γ -zein gene and greater accumulation of the protein in vitreous QPM lines compared to *o2* lines (Figure 1A). Wu *et al.* (2010) used RNAi to block the expression of 27 kDa γ -zein in the CM105*mo2* maize line; and found that RNAi caused the reversal of the vitreous phenotype to *o2*, demonstrating that 27 kDa γ -zein plays an essential role in the modification of the endosperm in QPM. Similar findings were reported by Yuan *et al.* (2014) who used γ -radiation mutagenesis to identify genes related to the modification of the *o2* mutant; they observed a generalized decrease in α -zeins and an increase in γ -zeins (27 and 50 kDa) in the K0326Y-QPM line compared to W64A+. The authors proposed that the 27 kDa γ -zein plays an important role in the formation of protein bodies and that the 50 kDa γ -zein, despite being in a smaller proportion, could also be involved in endosperm modification.

A genetic analysis in QPM RILs identified a *locus* (*qy27*) on chromosome 7 that results from the duplication of the 27 kDa γ -zein gene and causes an increase in gene expression and the synthesis of 27 kDa γ -zein in QPM and wild-type lines, confirming that the improved expression of 27 kDa γ -zein is critical for endosperm modification in QPM (Liu *et al.*, 2016). The higher expression of 27 kDa γ -zein causes that QPM endosperm accumulates a greater amount of small protein bodies, which are suggested to allow the formation of a more rigid vitreous matrix that resembles a wild type of maize endosperm (Figure 3A) (Wu *et al.*, 2010).

Alteration in starch composition and structure

The non-zein fraction in maize endosperm includes metabolic enzymes that may also play a role in QPM endosperm modification. Gibbon *et al.* (2003) performed a gel-based proteomic analysis of non-zeins in maize near isogenic lines contrasting in vitreousness (CM105+, CM105*o2* and CM105*mo2*), and found that the vitreous QPM line showed an increased accumulation of the enzyme granule-bound starch synthase I (GBSSI), which is responsible for the synthesis of amylose. The authors also found that amylopectin in the vitreous endosperms showed a higher proportion of short branches

compared to that of normal and *o2*. These alterations in starch structure may increase the proportion of amorphous regions at the surface of starch granules, which favors their compaction and the vitreous phenotype (Figure 3A). These results suggested that starch biosynthetic enzymes may play an important role in endosperm modification.

Genetic analyses of the cross between K0326Y-QPM and W64Ao2 found a locus for vitreousness on chromosome 9 near genes involved in starch biosynthesis (Holding *et al.*, 2008; Holding *et al.*, 2011). The biochemical characterization of this locus, using RILs derived from the same cross, showed that starch from vitreous mature endosperms had higher levels of amylose and lower crystallinity compared to starch from opaque endosperms, which was associated with lower gelatinization enthalpy (Salazar-Salas *et al.*, 2014). This behavior was also observed by Juárez-García *et al.* (2013) who reported lower enthalpy values in starches from vitreous lines compared to those from opaque lines at the mature state. These results could be explained by the higher proportion of amylose and short branches of amylopectin in starch from the vitreous lines. Short branches of amylopectin can reduce crystal formation, while a higher proportion of long chains can form more organized crystals that require higher temperature and gelatinization enthalpy (Jane *et al.*, 1999). These studies suggest that alterations in the amylopectin structure play an important role in the modification of the endosperm.

Wu *et al.* (2015) reported that SSSIII may affect pullulanase activity and indirectly influence the vitreousness of the kernel by altering the distribution and length of the amylopectin glucan chains. Soluble starch synthase I (SSSI) produces short chains with degrees of polymerization (GP) of 8 - 12, while SSSII and SSSIII isoforms seem to be involved in the formation of intermediate (GP 13 - 25) and long (GP > 30) chains, respectively (Nakamura *et al.*, 2005). A higher proportion of amylopectin intermediate chains (GP 10 - 24) and a decrease in the proportion of chains with GP of 25 - 40 was observed in starch from K0326Y-QPM and vitreous RILs with respect to starch from W64Ao2 and opaque RILs, which was associated with a higher proportion of amorphous regions in the starch granules that favors their compaction adopting polygonal shapes (Gibbon *et al.*, 2003; Salazar-Salas *et al.*, 2014). This provides a mechanism that complements the one associated with an increase in small protein bodies rich in γ -zein (27 kDa) that fill the spaces between the starch granules creating the vitreous phenotype (Figure 3A).

Genetic mapping of starch physicochemical properties in RIL derived from K0326Y QPM and W64Ao2 identified three *loci* on bins 4.05, 5.04, and 9.03 close to the starch biosynthesis genes *Brittle-2* (*Bt2*), *Amylose extender-1* (*Ae1*), and *Waxy-1* (*Wx1*), respectively (Vega-Alvarez *et al.*, 2022); the analysis of gene expression in developing endosperm (30 days after pollination, DAP) showed that the transcript levels of *Wx1* were significantly higher in K0326Y QPM and vitreous RILs compared with W64Ao2 and opaque lines, which corresponded to a greater GBSSI and amylose accumulation in the vitreous lines at the same developmental stage. These results

are in agreement with those reported in mature endosperm (Salazar-Salas *et al.*, 2014) and confirms an important role for GBSSI in the modification of the QPM endosperm. Jia *et al.* (2013) analyzed the expression in developing endosperm (22 DAP) of W64Ao2 and its normal counterpart and found a lower expression of *Wx1* in the opaque mutant. This study also revealed that the expression of genes encoding pullulanase (*Zpu1*) and starch branching IIb (SBEIIb) enzymes was higher in W64Ao2 than W64A+. The regulation of these genes may change the proportions of amylose and the branching patterns of amylopectin in the starch granules of the *o2* mutant contributing to the soft endosperm. Gonzalez-Nuñez (2022) analyzed the activity of GBSSI and SBEIIb in developing endosperms (28 DAP) of K0326Y-QPM, W64Ao2 and RIL contrasting in vitreousness; the GBSSI activity was higher in the endosperm of the vitreous lines and was associated with a higher proportion of amylose, whereas the activity of SBEIIb was higher in opaque lines that showed higher levels of amylopectin. These results support the hypothesis that endosperm modification in QPM is associated with the synthesis of starch with a higher proportion of amylose, which may facilitate the packing of the starch granules resulting in the vitreous phenotype (Figure 3A).

Modulation of carotenoid composition in amyloplast envelope

Wang *et al.* (2020) identified *Ven1* as a major QTL influencing the vitreous phenotype in the mature maize kernel. *Ven1* encodes for the enzyme β -carotene hydroxylase 3, which modulates the composition of carotenoids in the amyloplast envelope. They observed that in the opaque endosperm is a dysfunctional *Ven1* allele that decreases the content of polar carotenoids and increases that of non-polar carotenoids in the amyloplast envelope, which provides greater stability to this structure that under normal circumstances disappears during kernel desiccation. The non-disruption of the amyloplast envelope results in a poor interaction between the protein bodies and the starch granules, leading to a soft endosperm (Figure 3A).

Amelioration of the stress response by increasing the energy availability

The development of the *o2* endosperm involves a stress response that reduces the energy levels and affects ATP-dependent processes such as zein proteins synthesis (Li *et al.*, 2020). This may be due to a reduction in the expression of pyruvate phosphate dikinase (PPDK1), affecting glycolysis and the energy production. Holding *et al.* (2008) and Holding *et al.* (2011) identified several differentially upregulated genes in QPM, including pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (PPPa), a non-ATP-dependent glycolytic enzyme. It was proposed that the higher activity of PPPa in QPM compensates the reduced availability of ATP in *o2* endosperm (Guo *et al.*, 2012). A cytosolic PPDK2 was also identified by these authors as an ATP-independent glycolytic enzyme. Li *et al.* (2020) also found PPPa as a candi-

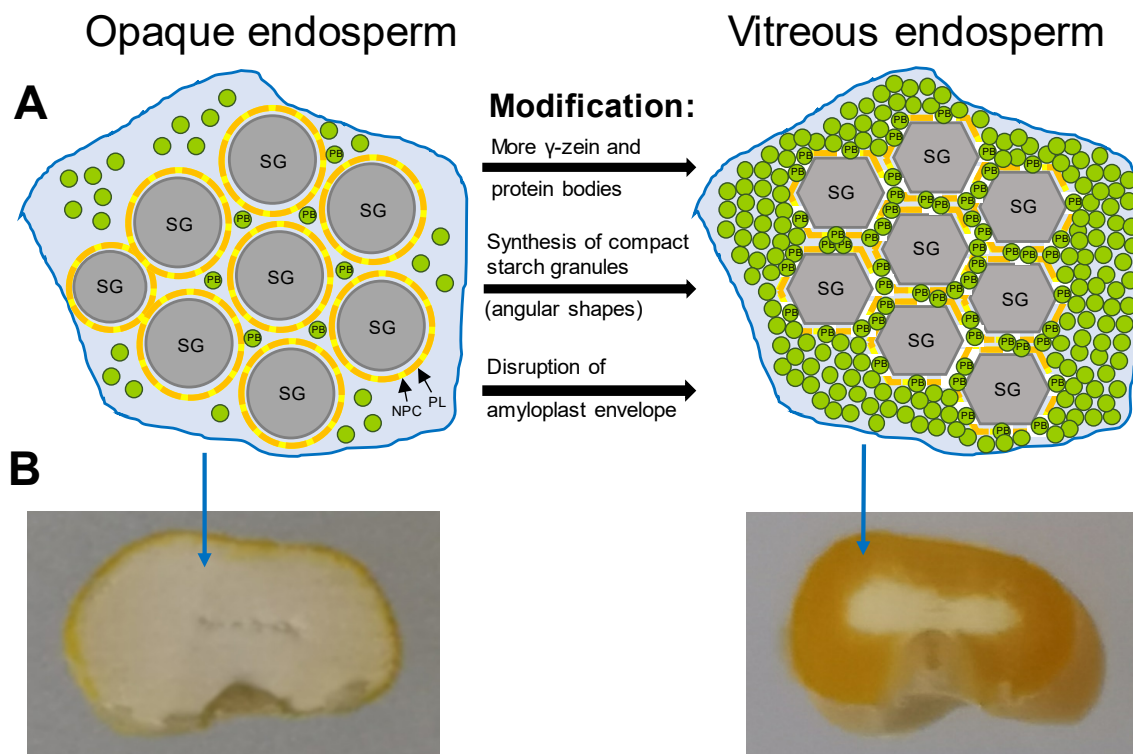


Figure 3. Vitreous endosperm formation in quality protein maize. (A) Representation of the main mechanisms associated with endosperm modification: Mechanism associated with an increase in protein bodies (PB) rich in 27 kDa γ -zein that fill the spaces between starch granules (SG); Mechanism associated with changes in the composition and morphology of the starch granules that favors their compaction and interaction with PBs; Mechanism associated with the disruption of the amyloplast membrane that favors the interactions between starch granules and PBs. PL, Phospholipids; NPC, Non-polar carotenoids. Adapted from Wang *et al.* (2020). (B) Cross section of mature kernels from *opaque-2* and QPM genotypes showing the extent of vitreous endosperm.

Figura 3. Formación del endospermo vítreo en el maíz de calidad de proteínica. (A) Representación de los principales mecanismos asociados con la modificación del endospermo: Mecanismo asociado con un incremento en cuerpos proteínicos (PB) ricos en γ -zeína 27 kDa que llenan los espacios entre los gránulos de almidón (SG); Mecanismos asociado con cambios en la composición y morfología de los gránulos de almidón que favorece su compactación e interacción con PBs; Mecanismo asociado con la ruptura de la membrana del amiloplasto que favorece las interacciones entre los gránulos de almidón y PBs. PL, fosfolípidos; NPC, carotenoides no polares. Adaptada de Wang *et al.* (2020). (B) Sección transversal de granos maduros de genotipos *opaco-2* y MCP mostrando la extensión del endospermo vítreo.

date gene for endosperm modification in QPM and identified cytosolic enolase (ENO) as another ATP-independent glycolytic enzyme. Thus, the increased synthesis of enzymes that do not require ATP for glycolysis in QPM provides energy by a mechanism that is repressed in *o2* endosperm.

CONCLUSIONS

There have been important advances in the understanding of the mechanisms associated with endosperm modification in QPM. However, the application of this information for the efficient development of QPM materials is difficult due to the multiple mechanisms involved in the creation of the vitreous endosperm. So far, the increased accumulation of 27 kDa γ -zeins seems to have the major contribution to the vitreous phenotype, which is complemented with the alterations in the composition and structure of the starch granules that favor their compaction, as well as with alterations in the composition of the amyloplast envelope that result in the

degradation of this structure during endosperm desiccation, allowing a better interaction between protein bodies and starch granules. These processes may not be possible without the availability of energy provided by enzymes that enhance the non-ATP-dependent glycolytic flux.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from National Council for Science and Technology CONACYT (167584 and 284552).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Akalu, G., Taffesse, S., Gunaratna, N.S. and De Groote, H. 2010. The effectiveness of quality protein maize in improving the nutritional status of young children in the Ethiopian highlands. *Food and Nutrition Bulletin* 31: 418-430.

- Babu, R., Nair, S.K., Kumar, A., Venkatesh, S., Sekhar, J.C., Singh, N.N., Srinivasan, G. and Gupta, H.S. 2005. Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 888-897.
- Burnett, R. and Larkins, B. 1999. *Opaque2* modifiers alter transcription of the 27-kDa γ -zein genes in maize. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 908-916.
- Chand, G., Muthusamy, V., Allen, T., Zunjare, R.U., Mishra, S.J., Singh, B., Mehta, B.K., Talukder, Z.A., Ismail, M.R., Sarika, K., Kamboj, M.C., Singh, S. and Hossain, F. 2022. Composition of lysine and tryptophan among biofortified-maize possessing novel combination of *opaque2* and *opaque16* genes. *Journal of Food Composition and Analysis* 107: 104376.
- Coleman, C.E. and Larkins, B.A. 1999. The prolamins of maize. In: *Seed Proteins*. P.R. Shewry and R. Casey (eds.), pp. 109-139. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.
- Comparot-Moss, S. and Denyer, K. 2009. The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *Journal of Experimental Botany* 60: 2481-2492.
- Cordova, H. 2001. The quality protein maize revolution: improved nutrition and livelihoods for the poor. In: *Maize Research Highlights 1999-2000*. pp. 27-31. CIMMYT, México.
- Coutiño Estrada, B. and Vázquez Carrillo, G. 2018. V238AC: new QPM yellow grain corn variety. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9: 1089-1092.
- Coutiño Estrada, B., Vázquez Carrillo, G. and Vidal Martínez, V.A. 2022. V56AC, first yellow grain QPM Oloton maize variety for the high valleys of Chiapas, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 45: 149-151.
- Das, O., Levi-Minzi, S., Koury, M., Benner, M. and Messing, J. 1990. A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 7809.
- Das, O.P., Poliak, E., Ward, K. and Messing, J. 1991. A new allele of the duplicated 27 kD zein locus of maize generated by homologous recombination. *Nucleic Acids Research* 19: 3325-3330.
- Desalegn, B.B., Abegaz, K. and Kifle, E. 2015. Effect of blending ratio and processing technique on physicochemical composition, functional properties and sensory acceptability of quality protein maize (QPM) based complementary food. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering* 5: 121-129.
- FAOSTAT. 2022. Food and Agriculture Organization Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Accessed August 18, 2022]. Available in <http://faostat.fao.org>.
- Geetha, K., Lending, C., Lopes, M., Wallace, J. and Larkins, B. 1991. *Opaque-2* modifiers increase gamma-zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell* 3: 1207-1219.
- Gevers, H.O. and Lake, J.K. 1992. Development of modified *opaque2* maize in South Africa. In: *Quality Protein Maize*. E.T. Mertz (ed.), pp. 49-78. American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, Minnesota.
- Gibbon, B.C. and Larkins, B.A. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics* 21: 227-233.
- Gibbon, B.C., Wang, X. and Larkins, B.A. 2003. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15329-15334.
- Gómez-M, N., Sierra-M, M., Cantú-A, M.A., Rodríguez-M, F.A., Manjarrez-S, M., González-C, M., Espinosa-C, A., Betanzos-M, E., Córdova-O, H., Caballero-H, F., Turrent-F, A., García-B, A., Ramírez, G., Sandoval-R, A., Coutiño-E, B., Cervantes-M, E., Reyes-M, C. and Nava-V, L. 2003. V-537C and V-538C, new high quality protein maize varieties for the Mexican tropics. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26: 213-214.
- Gonzalez-Nuñez, D.G. 2022. Análisis de expresión génica y actividad de enzimas de síntesis de almidón y su asociación con la modificación del endospermo en maíz de calidad proteínica. Ph.D Thesis, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa.
- Grover, K., Arora, S. and Choudhary, M. 2020. Development of quality protein product using biofortified maize to combat malnutrition among young children. *Cereal Chemistry* 97: 1037-1044.
- Gunaratna, N.S., Groote, H.D., Nestel, P., Pixley, K.V. and McCabe, G.P. 2010. A meta-analysis of community-based studies on quality protein maize. *Food Policy* 35: 202-210.
- Gunaratna, N.S., Moges, D. and De Groot, H. 2019. Biofortified maize can improve quality protein intakes among young children in southern Ethiopia. *Nutrients* 11: 192-207.
- Guo, X., Ronhovde, K., Yuan, L., Yao, B., Soundararajan, M.P., Elthon, T., Zhang, C. and Holding, D.R. 2012. Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase induction and attenuation of Hsp gene expression during endosperm modification in quality protein maize. *Plant Physiology* 158: 917-929.
- Guo, X., Yuan, L., Chen, H., Sato, S.J., Clemente, T.E. and Holding, D.R. 2013. Nonredundant function of zeins and their correct stoichiometric ratio drive protein body formation in maize endosperm. *Plant Physiology* 162: 1359-1369.
- Gupta, H.S., Agrawal, P.K., Mahajan, V., Bisht, G.S., Kumar, A., Verma, P., Srivastava, A., Saha, S., Babu, R., Pant, M.C. and Mani, V.P. 2009. Quality protein maize for nutritional security: rapid development of short duration hybrids through molecular marker assisted breeding. *Current Science* 96: 230-237.
- Gupta, H.S., Raman, B., Agrawal, P.K., Mahajan, V., Hossain, F. and Thirunavukkarasu, N. 2013. Accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of *opaque-2* allele. *Plant Breeding* 132: 77-82.
- Gutiérrez-Dorado, R., Ayala-Rodríguez, A.E., Milán-Carrillo, J., López-Cervantes, J., Garzón-Tiznado, J.A., López-Valenzuela, J.A., Paredes-López, O. and Reyes-Moreno, C. 2008. Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays* L.). *Cereal Chemistry* 85: 808-816.
- Holding, D.R., Hunter, B.G., Chung, T., Gibbon, B.C., Ford, C.F., Bharti, A.K., Messing, J., Hamaker, B.R. and Larkins, B.A. 2008. Genetic analysis of *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 157-170.
- Holding, D.R., Hunter, B.G., Klingler, J.P., Wu, S., Guo, X., Gibbon, B.C., Wu, R., Schulze, J.-M., Jung, R. and Larkins, B.A. 2011. Characterization of *opaque2* modifier QTLs and candidate genes in recombinant inbred lines derived from the K0326Y quality protein maize inbred. *Plant Molecular Biology* 122: 783-794.
- Hossain, F., Muthusamy, V., Pandey, N., Vishwakarma, A.K., Baveja, A., Zunjare, R.U., Thirunavukkarasu, N., Saha, S., Manjaiah,

- K.M.M., Prasanna, B.M. and Gupta, H.S. 2018. Marker-assisted introgression of *opaque2* allele for rapid conversion of elite hybrids into quality protein maize. *Journal of Genetics* 97: 287-298.
- Hossain, F., Sarika, K., Muthusamy, V., Zunjare, R.U. and Gupta, H.S. 2019. Quality protein maize for nutritional security. In: *Quality Breeding in Field Crops*. A.M.I. Qureshi, Z.A. Dar and S.H. Wani (eds.), pp. 217-237. Springer International Publishing, Cham.
- Huang, L., Tan, H., Zhang, C., Li, Q. and Liu, Q. 2021. Starch biosynthesis in cereal endosperms: An updated review over the last decade. *Plant Communications* 2: 100237.
- Huang, S., Frizzi, A., Florida, C.A., Kruger, D.E. and Luethy, M.H. 2006. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Molecular Biology* 61: 525-535.
- Jane, J., Chen, Y., Lee, L., McPherson, A., Wong, K., Radosavljevic, M. and Kasemsuwan, T. 1999. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry* 76: 629-637.
- Jia, M., Wu, H., Clay, K.L., Jung, R., Larkins, B.A. and Gibbon, B.C. 2013. Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the *opaque2* mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biology* 13: 60.
- Jiang, Y., Sun, K. and An, X. 2022. CRISPR/Cas system: applications and prospects for maize improvement. *ACS Agricultural Science & Technology* 2: 174-183.
- Jilo, T. 2022. Nutritional benefit and development of quality protein maize (QPM) in Ethiopia: review article. *Cereal Research Communications* 50: 559-572.
- Juárez-García, E., Agama-Acevedo, E., Gómez-Montiel, N.O., Pando-Robles, V. and Bello-Pérez, L.A. 2013. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 2660-2668.
- Kodrzycki, R., Boston, R.S. and Larkins, B.A. 1989. The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* 1: 105-114.
- Kostadinovic, M., Ignjatovic-Micic, D., Vancetovic, J., Ristic, D., Bozinovic, S., Stankovic, G. and Mladenovic Drinic, S. 2016. Development of high tryptophan maize near isogenic lines adapted to temperate regions through marker assisted selection - impediments and benefits. *PLoS One* 11: e0167635.
- Krishna, M.S.R., Sokka Reddy, S. and Satyanarayana, S.D.V. 2017. Marker-assisted breeding for introgression of *opaque-2* allele into elite maize inbred line BML-7. *3 Biotech* 7: 165.
- Krivanek, A.F., De Groote, H., Gunaratna, N.S., Diallo, A.O. and Friesen, D. 2007. Breeding and disseminating quality protein maize (QPM) for Africa. *African Journal of Biotechnology* 6: 312-324.
- Larkins, B.A. 2019. Proteins of the kernel. In: *Corn: Chemistry and Technology*. S.O. Serna-Saldivar (ed.), pp. 319-336. Woodhead Publishing and AACCI International Press, Duxford, U.K.
- Lending, C. and Larkins, B. 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell* 1: 1011.
- Li, C., Xiang, X., Huang, Y., Zhou, Y., An, D., Dong, J., Zhao, C., Liu, H., Li, Y., Wang, Q., Du, C., Messing, J., Larkins, B.A., Wu, Y. and Wang, W. 2020. Long-read sequencing reveals genomic structural variations that underlie creation of quality protein maize. *Nature Communications* 11: 17.
- Liu, H., Shi, J., Sun, C., Gong, H., Fan, X., Qiu, F., Huang, X., Feng, Q., Zheng, X., Yuan, N., Li, C., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, J., Pan, G., Han, B., Lai, J. and Wu, Y. 2016. Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa γ -zein for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 4964-4969.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. 1991. Gamma-zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize. *Crop Science* 31: 1655-1662.
- Lopes, M.A., Takasaki, K., Bostwick, D.E., Helentjaris, T. and Larkins, B.A. 1995. Identification of two *opaque2* modifier loci in Quality Protein Maize. *Molecular Genetics and Genomics* 247: 603-613.
- Lopez-Valenzuela, J.A., Gibbon, B.C., Holding, D.R. and Larkins, B.A. 2004. Cytoskeletal proteins are coordinately increased in maize genotypes with high levels of eEF1A. *Plant Physiology* 135: 1784-1797.
- Maqbool, M.A., Issa, A.B. and Khokhar, E.S. 2021. Quality protein maize (QPM): Importance, genetics, timeline of different events, breeding strategies and varietal adoption. *Plant Breeding* 140: 375-399.
- Mertz, E.T., Bates, L.S. and Nelson, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145: 279-280.
- Muleya, M., Tang, K., Broadley, M.R., Salter, A.M. and Joy, E.J.M. 2022. Limited supply of protein and lysine is prevalent among the poorest households in Malawi and exacerbated by low protein quality. *Nutrients* 14: 2430.
- Nakamura, Y., Francisco, P.B., Hosaka, Y., Sato, A., Sawada, T., Kubo, A. and Fujita, N. 2005. Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. *Plant Molecular Biology* 58: 213-227.
- Noriega González, L.A., Preciado Ortiz, R.E., Andrio Enríquez, E., Terrón Ibarra, A.D. and Covarrubias Prieto, J. 2011. Phenology, plant growth and floral synchrony of the parental lines of H-374C QPM maize hybrid. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 489-500.
- Or, E., Boyer, S.K. and Larkins, B.A. 1993. *Opaque2* modifiers act post-transcriptionally and in a polar manner on gamma-zein gene expression in maize endosperm. *Plant Cell* 5: 1599-1609.
- Paez, A.V., Helm, J.L. and Zuber, M.S. 1969. Lysine content of *opaque-2* maize kernels having different phenotypes. *Crop Science* 9: 251-252.
- Pfister, B. and Zeeman, S.C. 2016. Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2781-2807.
- Pineda-Hidalgo, K.V., Lavin-Aramburo, M., Salazar-Salas, N.Y., Chavez-Ontiveros, J., Reyes-Moreno, C., Muy-Rangel, M.D., Larkins, B.A. and Lopez-Valenzuela, J.A. 2011. Characterization of free amino acid QTLs in maize *opaque2* recombinant inbred lines. *Journal of Cereal Science* 53: 250-258.

- Ren, Y., Yobi, A., Marshall, L., Angelovici, R., Rodriguez, O. and Holding, D.R. 2018. Generation and evaluation of modified *opaque-2* popcorn suggests a route to quality protein popcorn. *Frontiers in Plant Science* 9: 1803-1803.
- Robyt, J.F. 2009. Enzymes and Their Action on Starch. In: *Starch* (Third Edition). J. BeMiller and R. Whistler (eds.), pp. 237-292. Academic Press, San Diego.
- Salazar-Salas, N.Y., Pineda-Hidalgo, K.V., Chavez-Ontiveros, J., Gutierrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., Bello-Pérez, L.A., Larkins, B.A. and Lopez-Valenzuela, J.A. 2014. Biochemical characterization of QTLs associated with endosperm modification in quality protein maize. *Journal of Cereal Science* 60: 255-263.
- Sawada, T., Itoh, M. and Nakamura, Y. 2018. Contributions of three starch branching enzyme isozymes to the fine structure of amylopectin in rice endosperm. 9.
- Serna-Saldivar, S.O. 2019. *Corn: Chemistry and Technology*. 3rd ed. Woodhead Publishing and AACC International Press. Duxford, U.K.
- Sethi, M., Singh, A., Kaur, H., Phagna, R.K., Rakshit, S. and Chaudhary, D.P. 2021. Expression profile of protein fractions in the developing kernel of normal, Opaque-2 and quality protein maize. *Scientific Reports* 11: 2469.
- Sierra Macías, M., Palafox Caballero, A., Rodríguez Montalvo, F., Espinosa Calderón, A., Vázquez Carrillo, G., Gómez Montiel, N. and Barrón Freyre, S. 2011. H-564C, high quality protein maize hybrid for the humid tropic in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 71-84.
- Surender, M., Shetti, P., Sagare, D.B., Rani, C.V.D., Jabeen, F., M.R., S. and Reddy, S.S. 2017. Development of QPM version of DHM117 maize hybrid using marker assisted selection. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 3275-3289.
- Twumasi-Afriyie, S., Palacios-Rojas, N., Friesen, D., Teklewold, A., Wegary, D., De Groote, H. and Prasanna, B.M. 2016. Guidelines for the quality control of Quality Protein Maize (QPM) seed and grain. CIMMYT, Addis Ababa, Ethiopia.
- Vega-Alvarez, E., Pineda-Hidalgo, K.V., Salazar-Salas, N.Y., Soto-López, O.A., Canizalez-Roman, V.A., Garzón-Tiznado, J.A., Gutierrez-Dorado, R. and Lopez-Valenzuela, J.A. 2022. Genetic and molecular analysis of starch physicochemical properties and its relationship with endosperm modification in quality protein maize. *Biotecnica XXIV*: 140-149.
- Villegas, E., Vasal, S., Bjarnason, M. and Mertz, E. 1992. Quality protein maize-what is it and how was it developed. In: *Quality Protein Maize*. E.T. Mertz (ed.), pp. 27-48. American Society of Cereal Chemists, Saint Paul, Minnesota.
- Vivek, B.S., Krivanek, A.F., Palacios-Rojas, N., Twumasi-Afriyie, S. and Diallo, A.O. 2008. Breeding quality protein maize (QPM): protocols for developing QPM cultivars. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Wallace, J.C., Lopes, M.A., Paiva, E. and Larkins, B.A. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified *opaque-2* maize. *Plant Physiology* 92: 191-196.
- Wang, H., Huang, Y., Xiao, Q., Huang, X., Li, C., Gao, X., Wang, Q., Xiang, X., Zhu, Y., Wang, J., Wang, W., Larkins, B.A. and Wu, Y. 2020. Carotenoids modulate kernel texture in maize by influencing amyloplast envelope integrity. *Nature Communications* 11: 5346.
- Wang, W., Niu, S., Dai, Y., Wang, M., Li, Y., Yang, W. and Zhao, D. 2019. The *Zea mays* mutants *opaque2* and *opaque16* disclose lysine change in waxy maize as revealed by RNA-Seq. *Scientific Reports* 9: 12265.
- Worral, H.M., Scott, M.P. and Hallauer, A.R. 2015. Registration of temperate quality protein maize (QPM) lines BQPM9, BQPM10, BQPM11, BQPM12, BQPM13, BQPM14, BQPM15, BQPM16, and BQPM17. *Journal of Plant Registrations* 9: 371-375.
- Wu, H., Clay, K., Thompson, S.S., Hennen-Bierwagen, T.A., Andrews, B.J., Zechmann, B. and Gibbon, B.C. 2015. Pullulanase and starch synthase III are associated with formation of vitreous endosperm in quality protein maize. *PLoS One* 10: e0130856.
- Wu, Y., Holding, D.R. and Messing, J. 2010. γ -zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 12810-12815.
- Yang, L., Wang, W., Yang, W. and Wang, M. 2013. Marker-assisted selection for pyramiding the waxy and *opaque16* genes in maize using cross and backcross schemes. *Molecular Breeding* 31: 767-775.
- Yuan, L., Dou, Y., Kianian, S.F., Zhang, C. and Holding, D.R. 2014. Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for gamma-zein in *opaque2* endosperm modification. *Plant Physiology* 164: 119-130.
- Zhou, Z., Song, L., Zhang, X., Li, X., Yan, N., Xia, R., Zhu, H., Weng, J., Hao, Z., Zhang, D., Yong, H., Li, M. and Zhang, S. 2016. Introgression of *opaque2* into waxy maize causes extensive biochemical and proteomic changes in endosperm. *PLoS One* 11: e0158971.

Bagazo y composta de bagazo de agave tequilero en suelos contrastantes: 1. Dinámica de degradación

Bagasse and compost of tequila agave bagasse in contrasting soils: 1. Degradation dynamics

Laura Liliana Acosta Sotelo¹, Juan Francisco Zamora Natera², Ramón Rodríguez Macías², Diego Raymundo González Eguiarte², Juan Fernando Gallardo Lancho³ y Eduardo Salcedo Pérez^{*2}

¹ Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas-Universidad de Guadalajara. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, 45200, Tel. 523337771150, Ext. 32924. Zapopan (Jalisco, México); Correo-e: laura.acosta1798@alumnos.udg.mx. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7110>.

² Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Guadalajara. Carretera a Nogales, km 15.5, Predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México); correo-e: juan.znatera@academicos.udg.mx; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8550-4616>. ramon.rmacias@academicos.udg.mx, ORCID: 0000-0003-0857-6699; diego.geguiarte@academicos.udg.mx, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6609-0780>; eduardo.salcedo@academicos.udg.mx, <https://orcid.org/0000-0002-5292-3099>;

³ CSIC, IRNASa (jubilado). Salamanca 37008, España; Correo-e: juanf.gallardo@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4174-3930>

RESUMEN

La industria tequilera del estado de Jalisco (México) genera un residuo sólido llamado bagazo de agave, el cual puede ser aprovechado como enmienda orgánica. Sin embargo, se desconoce su dinámica de descomposición en el suelo. El objetivo del trabajo, fue evaluar la dinámica de degradación de cuatro materiales, bagazo autoclave (BA); bagazo difusor (BD); composta bagazo autoclave (CBA); y composta bagazo difusor (CBD), incubados en dos suelos contrastantes (Regosol y Luvisol) durante un año, midiendo masa seca remanente (MSR) mediante la técnica de bolsas de descomposición y determinando la constante de descomposición (k); y coeficiente isohúmico (C_i). La MSR mostró diferencias significativas entre materiales y suelos, las mayores pérdidas se presentaron en BD y BA 74 y 62 % en Regosol y 62 y 47 % en Luvisol. Los mayores valores de k se presentaron en BD en Regosol (0,0099) y Luvisol (0,0074), seguido del BA en Regosol (0,0059) y Luvisol (0,0025). Los bagazos presentaron valores bajos en C_i (0,51 y 0,72 con BA y 0,37 y 0,48 con BD, en Regosol y en Luvisol, respectivamente). La MSR y el C_i revelaron que los procesos de degradación fueron más intensos y acelerados en los bagazos que en las compostas.

Palabras claves: residuos orgánicos, mineralización, suelos, tasa de descomposición.

ABSTRACT

The tequila industry in the state of Jalisco (Mexico) generates a solid residue called agave bagasse, which can be used as an organic amendment. However, its decomposition dynamics in soil is unknown. The objective of the work was to evaluate the degradation dynamics of four materials: autoclaved bagasse (BA); diffuser bagasse (BD); Autoclaved bagasse compost (CBA); and Diffusion bagasse compost (CBD), incubated in two contrasting soils (Regosol and Luvisol) for one year, measuring remaining dry mass (MSR) using the decomposition bag technique and determining the decomposition

constant (k) and isohumic coefficient (C_i). The MSR showed significant differences between materials and soils, the highest losses occurred in BD and BA 74 and 62 % in Regosol and 62 and 47 % in Luvisol. The highest values of k occurred in BD in Regosol (0,0099) and Luvisol (0,0074), followed by BA in Regosol (0,0059) and Luvisol (0,0025). Bagasse presented low C_i values (0,51 and 0,72 with BA and 0,37 and 0,48 with BD, in Regosol and Luvisol, respectively). The MSR and the C_i revealed that the degradation processes were more intense and accelerated in the bagasse than in the composts.

Keywords: organic residues, mineralization, soils, rate of decomposition.

INTRODUCCIÓN

Los daños ambientales ocasionados a los suelos agrícolas debido a prácticas incorrectas de manejo y fertilización han originado un renovado interés por las actividades ancestrales de incorporación de residuos orgánicos al suelo (Anguria *et al.*, 2017; Dzomeku y Osman, 2018; Suvain *et al.*, 2021). Debido al potencial por mejorar las propiedades fisicoquímicas, así como por la capacidad para mantener el apropiado funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos (Rousk y Bengtson, 2014). En este contexto, existe una tendencia mundial a incrementar la reutilización de los residuos orgánicos generados. En la Ciudad de México, por ejemplo, se generan diariamente cerca de 14,155 t de residuos orgánicos, los cuales provienen de la industria de alimentos, así como del sector agroindustrial y doméstico, entre otros (Muñoz y Morales, 2018), lo cual indica que existe un gran potencial si se reutilizaran tales residuos tras su correcto tratamiento. De acuerdo con Saval (2012), los RO agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización y, aunque ya no son de utilidad para el proceso que los generó, son susceptibles de aprovechamiento.

*Autor para correspondencia: Eduardo Salcedo Pérez
 Correo electrónico: eduardo.salcedo@academicos.udg.mx

Recibido: 19 de agosto 9 de 2022

Aceptado: 23 de enero de 2023

En el Estado de Jalisco (México) el agave azul (*Agave tequilana* Weber var. Azul) para la obtención de tequila es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica (Sánchez, 2016). Sin embargo, la continua y creciente demanda de tequila a nivel nacional e internacional da lugar a la generación de altos volúmenes de residuos, líquidos (vinazas) y sólidos (bagazo) (Vargas y Pérez, 2018). El bagazo de agave es un material compuesto por fibras ligno-celulósicas de diferente longitud que se obtiene después de someter el tallo del agave a diferentes procesos de extracción de azúcares. De acuerdo con el Consejo Regulador del Tequila (CRT) durante el periodo de 2010 al 2020 se utilizaron en la producción de tequila 110,144 ton de tallos de Agave (CRT, 2020), de las cuales el 40% se recuperan como residuo (Cedeño, 1995). A pesar de que la denominación de origen del "Tequila" se estableció en 1978, su producción (debido a su alta demanda) aumentó tras 1995 (Macías y Valenzuela, 2009), lo que ocasionó también un incremento de bagazo, el cual fue considerado a principios del año 2000 un desecho residual contaminante debido a su mal manejo (Rodríguez et al., 2010). Entre los años 2000 y 2010 se intensificaron los estudios con el propósito de encontrar alternativas para aprovechar la biomasa de este residuo como biocombustible, alimento para animales, para la obtención de biopolímeros, entre otros (Ramírez et al., 2012; Vargas y Pérez, 2018).

En el ámbito agrícola se estudió el potencial de este residuo orgánico como componente de sustratos para el crecimiento inicial de diferentes especies vegetales (Rodríguez et al., 2010, Crespo et al., 2013). Debido a que estas alternativas no solucionaron de manera significativa la reducción y disposición de este residuo, actualmente las empresas dedicadas a la producción de tequila incorporan este residuo transformado en composta sobre suelos destinados al cultivo de agave. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la dinámica de descomposición y mineralización de este residuo. Al respecto Vos et al. (2013) reportaron que, para un manejo exitoso en el reciclado de los nutrientes a partir de residuos orgánicos, es necesario primero conocer el proceso de descomposición y la influencia que esta tendrá en la dinámica del C y N. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar la dinámica descomposición en bagazo y compostas de bagazo de agave azul (*Agave tequilana* Weber var. Azul) mediante incubaciones en dos diferentes suelos (Regosol y Luvisol).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

La investigación se realizó del 1° de julio del 2019 al 1° de julio del 2020 en el Centro Universitario de Ciencia Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México (20,7° 43' N y 103,5° 23' O y 1,550 m s.n.m.), la temperatura media anual y precipitación es de 19,4 °C y 957 mm año⁻¹, respectivamente. Aproximadamente del 85 al 90 % de la precipitación total ocurre durante los meses de junio a octubre (Figura 1).

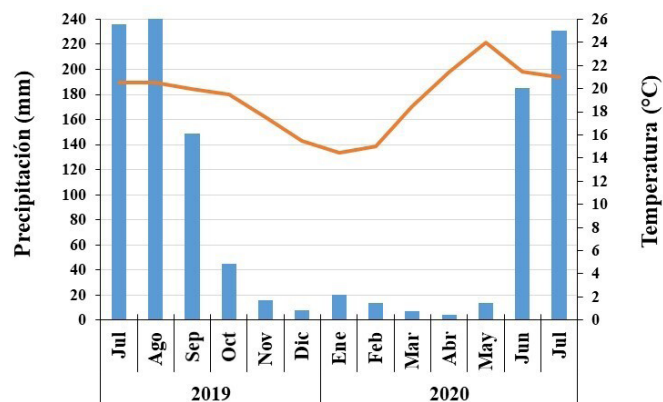


Figura 1. Condiciones climáticas durante la etapa del experimento (SMN-CONAGUA, 2018). Barras verticales: Precipitación mensual, línea: Oscilación de la temperatura media mensual.

Figure 1. Climatic conditions during the experimental stage (SMN-CONAGUA, 2018). Vertical bars: Monthly precipitation, line: Oscillation of the average monthly temperature.

Residuos orgánicos evaluados y suelos utilizados

Se utilizó bagazo de agave obtenido por dos procesos diferentes de extracción de azúcares; uno proveniente de la cocción en autoclave, molienda y prensado denominado para este estudio bagazo de autoclave (BA); y el otro obtenido mediante difusión con agua caliente llamado bagazo de difusor (BD). También se utilizaron estos bagazos en forma de compostas: composta bagazo de autoclave (CBA) y composta de bagazo del difusor (CBD), siendo elaboradas de acuerdo, a los procedimientos recomendados por Iñiguez et al. (2011). Las características químicas de los materiales estudiados se presentan en la (Tabla 1).

Por otra parte, se utilizaron dos suelos contrastantes y ampliamente distribuidos en el estado de Jalisco: Regosol y Luvisol crómico de acuerdo al sistema de clasificación de la W.R.B. (2015). En la Tabla 2, se muestran las características químicas y físicas de los suelos, las cuales fueron determinadas de acuerdo con la NOM 021 RECNAT (2000).

Establecimiento y diseño del experimento

Se utilizaron 14 cubetas de plástico con capacidad de 19 L, con un diámetro superior y altura de 29,5 y 36,0 cm, respectivamente. Se colocaron aproximadamente 20 kg de suelo seco en cada cubeta (siete cubetas para cada tipo de suelo). Se utilizaron un total de 168 bolsas de nylon de la marca Ankom, de 5,0 x 10,0 cm² y de 1,0 mm de abertura de malla,

Tabla 1. Caracterización química inicial de los residuos orgánicos empleados.

Table 1. Initial chemical characterization of the organic waste used.

	Concentración inicial (mg g ⁻¹)					Relación C/N
	Carbono	Nitrógeno	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	
BA	41.2	0.52	40.4	10.0	10.0	79
BD	40.9	0.56	33.0	9.1	6.5	74
CBA	23.3	1.28	26.3	7.1	11.1	18.3
CBD	24.0	1.85	23.5	8.1	11.6	12.8

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los suelos empleados en este estudio.

Table 2. Physical and chemical properties of the soils used in this study.

Suelo	Partículas minerales			Textura	MOS (%)	D _{ap} (Mg m ⁻³)	pH (agua)
	Arena	Limo	Arcilla				
Regosol	59,8	26,0	14,2	Franco arenosa	1,39	1,09	5,1
Luvisol	33,8	36,0	30,2	Franco limosa	1,26	0,97	6,6

MOS: Materia orgánica del suelo, D_{ap}: Densidad aparente, pH: Potencial de hidrógeno.MOS: Soil organic matter, D_{ap}: Bulk density, pH: Hydrogen potential.

las cuales son utilizadas para conocer la descomposición y mineralización en diferentes materiales orgánicos en el suelo (Kriauciuniene et al., 2012; Loaiza-Usuaga et al., 2013; Gao et al., 2016; Bonilla et al., 2020). En cada una de las bolsas se colocaron 5.00 g en base seca de cada uno de los RO en estudio. En cada cubeta se colocaron tres bolsas de descomposición por cada RO evaluado a -10 cm de profundidad (12 bolsas en cada cubeta). Las cubetas con su suelo correspondiente y las bolsas con el RO en su interior se trasladaron al área de vivero, donde fueron distribuidas en un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (4 x 2 x 7), con tres repeticiones; esto es, los factores estudiados fueron 4 materiales orgánicos, 2 tipos de suelo y 7 muestreos consecutivos distribuidos en un año. El estudio inició el 1 de julio de 2019 y concluyó el 1 de julio de 2020, habiendo sido el periodo de mayor precipitación en esta región ocurrió desde el mes de junio hasta octubre de 2019. La evaluación consistió en retirar las bolsas de las cubetas correspondientes a cada tipo de suelo (24 bolsas en total) a los 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 365 d después de haber enterrado las bolsas. Estas se abrieron y el material orgánico recuperado se colocó en estufa de aire forzado a 70 °C durante 48 h; se retiró el residuo de la estufa y se pesó en una balanza analítica Hanchen.

Variables evaluadas

La descomposición de los RO se evaluó como porcentaje de materia seca remanente (MSR) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{MSR} (\%) = \frac{\text{Psm}}{\text{Psi}} \times 100$$

donde: Psm es peso seco del material remanente en cada periodo de muestreo y Psi es el peso seco del material inicial (5.00 g).

La constante de descomposición k fue determinada siguiendo el modelo simple exponencial de degradación propuesto por Olson (1963), mediante la siguiente fórmula:

$$k = \frac{-\ln(X/X_0)}{t}$$

donde: k es la tasa relativa de descomposición, X representa la cantidad de materia seca remanente después de un tiempo dado, X_0 es la cantidad de materia seca inicial (5,00 g) y t es el tiempo transcurrido (en d). Esta constante k es un indicador de la velocidad a la que se descomponen los RO y puede fluctuar entre 0,10 por d (para residuos de muy rápida

descomposición) a 0.00001 por d (para residuos de muy lenta degradación (Berg, 2000).

El coeficiente isohúmico (C_i) es la fracción del RO que resta sin descomponer o se descompone muy lentamente después de un periodo de tiempo; y se determina a través de la fracción del material residual orgánico resistente ($RO_{\text{recalcitrante}}$) a la descomposición microbológica en relación con la cantidad colocada inicialmente (Vanholme et al., 2010), aplicando la siguiente ecuación:

$$C_i = \frac{RO_{\text{recalcitrante}}}{RO_{\text{inicial aportado}}}$$

Análisis estadísticos

El porcentaje de materia seca remanentes (% MSR), la constante de descomposición (k) y el coeficiente isohúmico (C_i) fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de promedios mediante la prueba Tukey ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico *Statgraphics Centurión XVII (Statgraphics, 2014)*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de materia seca remanente (MSR)

Se observaron diferencias significativas en todas las variables evaluadas, por efecto de los RO, suelos y muestreos ($P < 0,05$). De acuerdo con la dinámica de degradación los RO formaron dos grupos definidos y contrastantes entre sí; el primero conformado por los dos bagazos (BA y BD) y el segundo por las dos compostas de bagazo (CBA y CBD). La MSR en las compostas después de un año de incubación independientemente de los suelos fue alta; mientras que la de las compostas de bagazo mostraron una escasa descomposición equivalente al 10 % aproximadamente. Lo anterior se debe probablemente a que la composta de agave utilizado en este estudio estaba completamente madura, lo cual se evidencia por su comportamiento estable durante el periodo de evaluación en los suelos. Este comportamiento no coincide a lo reportado por Figueroa-Barrera et al. (2012) y Rodríguez et al. (2022) quienes con diferentes tipos de compostas registraron valores de descomposición más altos que los encontrados en este estudio (hasta 72 %). Es posible que los altos valores de descomposición registrados en los anteriores trabajos estén relacionados con el uso de compostas elaboradas en condiciones sub-óptimas durante el proceso de compostaje y al uso de compostas inmaduras, por lo que aún permanecen materiales orgánicos lábiles susceptibles al ataque de micror-

ganismos después de su incorporación al suelo (Medina *et al.*, 2018; Muñoz-Villalobos *et al.*, 2021). Los bagazos, independientemente del origen y el tipo de suelo, mostraron las mayores pérdidas de MSR (Figura 2a, 2b). En ambos suelos el BA en comparación con el BD presentó las menores pérdidas de biomasa (MSR) durante todo el periodo de evaluación. Lo anterior indicó que BD en comparación al BA resultó ser el material más lábil o menos resistente al proceso de descomposición en ambos suelos después de un año de evaluación lo que se correspondió con un 74 y 62 % de descomposición en el Regosol y Luvisol, respectivamente, mientras que el bagazo de autoclave (BA) presentó una mayor resistencia a la descomposición con valores de 62 % en Regosol y 47 % en Luvisol, respectivamente. A pesar de que la tendencia a perder biomasa fue similar en ambos tipos de suelo, se puede observar que los bagazos en el Luvisol mostraron mayor resistencia a la descomposición con porcentajes de 52,6 % en BA y 38,1 % en BD, mientras que en Regosol los porcentajes de descomposición fueron más próximos, de 38,1 % y 25,9 %, respectivamente. El proceso de descomposición de los bagazos principalmente con base en la MSR se presentó en diferentes etapas, tal y como fue observado con otros RO (Gao *et al.*, 2016; Bonilla *et al.*, 2020). En este estudio durante los primeros 60 días se presentó una fase bastante

rápida de pérdida de MS debido a que durante este periodo se presentaron los mayores eventos de precipitación (Figura 1) y en consecuencia se solubilizaron las fracciones lábiles o de fácil descomposición como: azúcares, aminoácidos, polifenoles condensados y solubles (Muñoz-Villalobos *et al.*, 2021); luego se observó otra etapa de pérdida gradual de biomasa cada vez más lenta con el transcurso del tiempo, lo cual se relaciona con la disminución de la precipitación en el área de estudio debido y a la presencia de sustancias recalcitrantes residuales en la biomasa, tales como la celulosa y principalmente ligninas (Villavicencio-Enríquez, 2012), (Figura 1). Aunque los dos bagazos estudiados proceden del mismo tipo de substrato orgánico (tallo y base de las hojas de agave) las diferencias observadas respecto a su composición química podrían ser atribuidas al proceso de extracción (Tabla 1). Los mayores porcentajes de descomposición en BD pueden ser explicados probablemente en términos de un menor contenido de compuestos químicos que interfieren con la descomposición o que limitan el ataque del microorganismo al RO como pueden la presencia de polifenoles, polisacáridos, taninos y alcaloides (Novita, 2016), ya que, durante la extracción de azúcares se realizan varios lavados con agua caliente. La pérdida de MSR es un indicador de la velocidad de descomposición de los RO adicionados; con base en lo anterior, Bonilla *et al.* (2020), al evaluar la dinámica de descomposición de una mezcla de residuos de gramíneas utilizando la misma metodología que en este estudio, reportaron porcentajes de descomposición del 70 %, porcentaje muy similar al que encontramos en este estudio principalmente en el suelo Regosol con 62 % para BA y 74 % para BD. Sin embargo, Gao *et al.* (2016), reportaron porcentajes de descomposición en residuos de trigo menores a los encontrados en este estudio (40 %) después de un año de evaluación. Las diferencias observadas en la evolución de la descomposición de los RO estudiados en el mismo suelo se atribuyen a la menor resistencia que ofrece el bagazo sin compostar al ataque microbiano, frente a la mayor resistencia que presentan los substratos que ya han sido sometido a un proceso previo de degradación como el compostaje, proceso en el que se

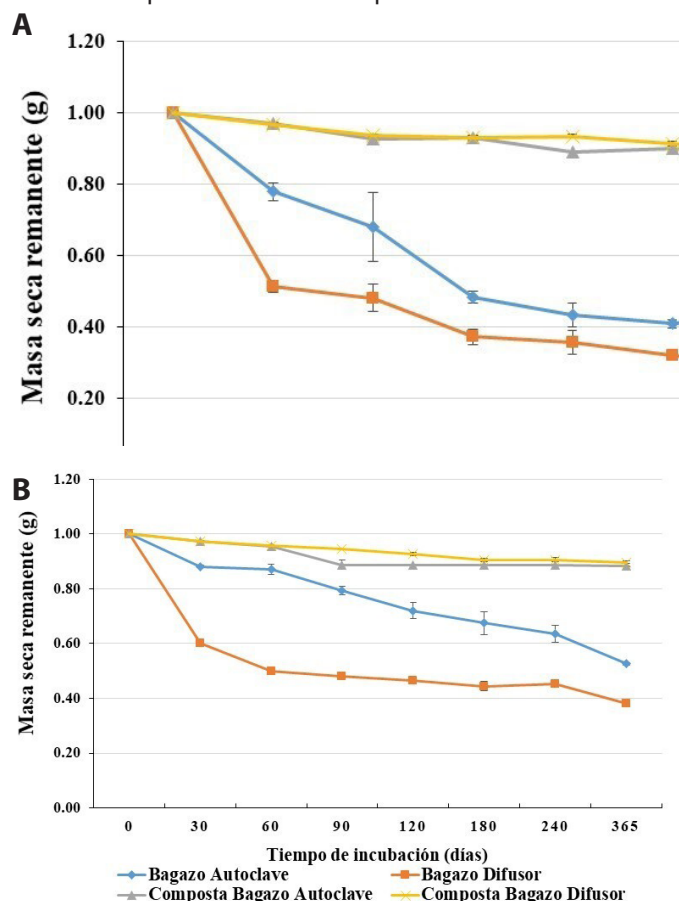


Figura 2. Dinámica temporal de descomposición de los materiales orgánicos en suelos Regosol (a) y Luvisol (b).
Figure 2. Temporal dynamics of decomposition of organic materials in Regosol (a) and Luvisol (b) soils.

Tabla 3. Análisis multifactorial categórico. Constante de descomposición (k) por tipo de RO en suelos Regosol y Luvisol.

Table 3. Categorical multifactorial analysis. Decomposition constant (k) by OR type in Regosol and Luvisol soils.

	Constante de descomposición (k)	
	Suelo Regosol	Suelo Luvisol
BA	0,0059 ± 0,0006 Ba	0,0025 ± 0,0002 Bb
BD	0,0099 ± 0,0013 Aa	0,0075 ± 0,0011 Ab
CBA	0,0008 ± 0,0001 C*	0,0008 ± 0,001 C*
CBD	0,0007 ± 0,0001 C*	0,0008 ± 0,001 C*

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. *No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$); letra mayúscula comparación entre tipo de materiales (transversal); letra minúscula comparación entre suelos (horizontal).

Different letters in the same column indicate significant differences. *No significant differences were found ($P < 0,05$); capital letter comparison between type of materials (transversal); lowercase letter comparison between soils (horizontal).

eliminan las fracciones orgánica lábiles (Gallardo, 2017). De acuerdo con los resultados (Figura 2a, 2b) se evidencia que los bagazos no presentaron resistencia a los procesos de degradación microbiana en los suelos desde el momento de ser incorporados al mismo (en especial BD en el Regosol), a este respecto, López y Estrada, (2015) mencionaron al respecto que la dinámica de descomposición se basa en que los RO contienen fracciones lábiles y recalitrantes, los cuales presentan diferentes grados de resistencia a la degradación microbiana; por el contrario, Gallardo (2017) indicó que subproductos orgánicos con relaciones C/N similares a las compostas de bagazos aquí estudiadas sí presentaron resistencia a su degradación. Por otra parte, las características edáficas diferentes en los suelos utilizados, en especial en cuanto al pH y contenidos de arcillas (Tabla 4) deben ejercer efectos contrapuestos; mientras que un pH más neutro (Luvisol) puede favorecer una más rápida mineralización inicial (por la mayor actividad bacteriana; Monsalve *et al.*, 2017), un mayor contenido en arcillas (Luvisol), por el contrario, aminora tal proceso por la adsorción de productos orgánicos, protegiéndolos del ataque microbiano (Gregory *et al.*, 2009), con lo que se aumenta la fracción recalitrante como se ha observado en el presente trabajo (Figura 2a, 2b). Consecuentemente, la degradación de los bagazos es más lenta en el Luvisol (debido a un mayor contenido de arcillas y propiedades relativas, como retención de humedad o fenómenos de adsorción de partículas las cuales protegen los compuestos orgánicos del ataque microbiano mediante la formación de micro y macroagregados; Lobo *et al.*, 2013); ello difiere de lo que sucedió en el Regosol, donde la degradación fue acelerada e intensa debido a la mayor oxigenación y menor protección por escasez de arcillas (Gallardo, 2017). De acuerdo con los comportamientos de degradación se presentaron diferencias significativas en los valores de MSR (Figura 2a, 2b) entre el bagazo colocado en el Regosol y el colocado en el Luvisol debido a las diferentes propiedades físicas (principalmente

textura y D_{ap}) y fisicoquímicas (pH; Cuadro 2) de los dos suelos seleccionados; tales propiedades edáficas diferentes deben influir en la degradación de los sustratos orgánicos lábiles, lo cual, concuerda con lo reportado por Bonilla *et al.* (2020) al emplear suelos de textura similar. Por tanto, el efecto protector de las arcillas es más fuerte que el del pH, dado que la mineralización es más intensa en el Regosol. Los comportamientos del proceso de degradación (evidenciados en la Figura 2a y 2b) permiten afirmar que dicho proceso está dado, en principio, por la composición química de los materiales orgánicos (frescos o compostados, que les otorga el nivel de resistencia al ataque microbiano) y, posteriormente, por las propiedades edáficas que juegan un papel menos importante en el proceso de degradación de los RO, dependiendo de la textura y acidez (Martínez *et al.*, 2020).

Constante de descomposición (k)

Esta variable fue estadísticamente diferente entre los bagazos, pero no fue significativamente diferente entre las compostas (Tabla 3). El BD mostró las mayores constantes de descomposición con 0,0099 y 0,0075 en el Regosol y Luvisol, respectivamente, mientras que el BA presentó los menores valores con 0,0059 y 0,0025 en el Regosol y Luvisol, respectivamente. Las compostas por el contrario presentaron una constante descomposición baja en ambos suelos debido a su alta bioestabilidad o por ser ya un material recalitrante (CBD $k = 0,0007$; y CBA $k = 0,0008$), lo cual tiene relación con lo observado en la dinámica de descomposición de los RO en este estudio. Assmann *et al.* (2014), evaluaron la tasa de descomposición en rastrojo de trigo en diferentes períodos de pastoreo, observando que la k no cambio significativamente con los días de pastoreo, obteniendo un promedio final a los 105 d de $0,023 \text{ d}^{-1}$; Gao *et al.*, (2016), estudiando la dinámica de descomposición en residuos de trigo bajo diferentes condiciones, encontraron que la k en condiciones aeróbicas fue de $0,022 \text{ d}^{-1}$, la cual es mayor a los valores de k encontrados en este estudio (Tabla 3). Las diferencias en los valores de k reportadas por otros autores y las encontradas en este estudio se deben a diferencias en la composición química de los materiales utilizados (contenido de N y relación C/N, polifenoles, polisacáridos, taninos, alcaloides y lignina), así como a las condiciones climáticas y edáficas en el área de estudio (Novita, 2016).

Coefficiente Isohúmico (C_i).

El coeficiente Isohúmico (C_i) mostró un comportamiento diferente entre los dos grupos de sustratos orgánicos. En el Regosol el C_i de BA (0,51) fue significativamente diferente al de BD (0,37), mientras que las dos compostas presentaron valores similares, pero significativamente más altos (alrededor de 0,92; Cuadro 4). En el Luvisol se observó una dinámica similar en cuanto al C_i ; mientras que BA presentó un C_i de 0,72, significativamente mayor al de BD con 0,48. En el caso de las compostas se comportaron igual en ambos suelos, presentando los más altos valores de C_i en los dos tipos de suelos y siendo similares ($C_i = 0,92$). La composición química

Tabla 4. Análisis multifactorial categórico. Coeficiente isohúmico por tipo de RO en suelos Regosol y Luvisol.

Table 4. Categorical multifactorial analysis. Isohumic coefficient by RO type in Regosol and Luvisol soils.

	Coeficiente Isohúmico (C_i)	
	Suelo Regosol	Suelo Luvisol
BA	0,51 ± 0,03 Bb	0,73 ± 0,03 Ba
BD	0,37 ± 0,02 Cb	0,48 ± 0,02 Ca
CBA	0,91 ± 0,01 A*	0,91 ± 0,01 A*
CBD	0,92 ± 0,01 A*	0,92 ± 0,01 A*

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. *No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$); letra mayúscula comparación entre tipo de materiales (transversal); letra minúscula comparación entre suelos (horizontal).

Different letters in the same column indicate significant differences. *No significant differences were found ($P < 0,05$); capital letter comparison between type of materials (transversal); lowercase letter comparison between soils (horizontal).

de los RO (Tabla 1) influyó de manera significativa en el proceso de degradación; así, después de un año de incubación se detectaron diferencias estadísticas significativas para el C_i en los bagazos, pero no para las compostas las cuales sufrieron degradación previa, homogeneizándose en gran parte (Salazar *et al.*, 2014). Además, se encontró que el BA presentó un valor significativo mayor de C_i (Tabla 4) que el otro bagazo (BD), lo que puede suponer una mayor aportación de C parcialmente estabilizado edáficamente (siempre que no surja el efecto negativo de la demanda de N; Oda y Sukchan, 2021). Las propiedades edáficas influyeron significativamente en la estabilidad de los bagazos, ya que presentaron un C_i significativamente mayor en el Luvisol que en el *Regosol*, lo cual se debe a que este último suelo no puede proporcionar una protección tan eficaz como la del Luvisol (más arcilloso), permitiendo una más acentuada progresión de la degradación en el *Regosol* (Martínez *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

La experimentación demostró que el bagazo de agave ofrece menos resistencia a la mineralización que las compostas, pero que se atenúa en el Luvisol en comparación con el *Regosol*. Por tanto, si se desea incentivar la actividad microbiana edáfica es preferible utilizar el bagazo, pero si lo que se pretende es incrementar el contenido el MOS es siempre preferible añadir la composta de bagazo, especialmente en el mejoramiento de la fertilidad de los *Regosoles*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca otorgada a la estudiante Laura Liliana Acosta Sotelo (CVU 658420) para la realización de sus estudios superiores.

REFERENCIAS

- Anguria, P., Chemining'wa, G.N., Onwonga, R.N., y Ugen, M.A. 2017. Effects of Organic Residues on Soil Properties and Sesame Water Use Efficiency. *Journal of Agricultural Science*; 9: 98-107.
- Assmann, T.S., de Bortolli, M.A., Assmann, A.L. Soares, A.B., Rocha, P.C.S., Franzluebbbers, A.J., Glienke, C.L. y Assmann, J.M. 2014. Does cattle grazing of dual-purpose wheat accelerate the rate of stubble decomposition and nutrients released?. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 190: 37-42.
- Berg, B. 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*. 133: 13-22.
- Bonilla, C.C., Díaz, J., Gil, C., Girón, K., León, M., Ortiz, O. y Suárez, A. 2020. Dinámica de la descomposición de residuos orgánicos. *Suelos ecuatoriales*. 50: 31-39.
- Cedeño, C.M. 1995. Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15: 1-11.
- Crespo, G.M., González, E.D., Rodríguez, M.R., Rendón, S.L., del Real L.J. y Torres, M.J. 2013. Evaluación de la composta de bagazo de agave como componente de sustratos para producir plántulas de agave azul tequilero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:1161-1173.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). [Consultado 14 Noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Dzomeku, K.I. y Osman, I. 2018. Effects of Groundnut Shell, Rice Husk and Rice Straw on the Productivity of Maize (*Zea mays* L.) and Soil Fertility in the Guinea Savannah Zone of Ghana. *Acta Scientific Agriculture*, 2: 29-35.
- Figueroa-Barrera, A., Álvarez-Herrera, J.G., Forero, A.F., Salamanca, C. y Pinzón, L.P. 2012. Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. *Temas Agrarios*. 17: 32-43.
- Gallardo, J. F. 2017. La materia orgánica del suelo: residuos orgánicos, humus, compostaje, captura de carbono. *Texcoco (Méjico): Universidad Autónoma de Chapingo*. I.S.B.N.:978-607-12-0474-5. 424 pp.
- Gao, H., Chen, X., Wei, J., Zhang, Y., Zhang, L., Chang, J., y Thomson M. L., 2016. Decomposition dynamics and changes in chemical composition of wheat straw residue under anaerobic and aerobic conditions. 11: 1-17.
- Gregory, A.S., Watts C.W., Griffiths, B.S., Hallet, P.D., Kuan, H.L. y Whitmore, A. P. 2009. The effect of long-term soil management on the physical and biological resilience of a range of arable and grassland soils in England. *Geoderma*. 153: 172-185
- Iñiguez, G., Martínez, G.A., Flores, P.A. y Virgen, G. 2011. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distinta de bagazo de Agave para la obtención de un sustrato para jitomate. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 27: 47-59.
- Kriauciuniene, Z., Velicka, R. y Raudonius, S. 2012. The influence of crop residues type on their decomposition rate in the soil: a litterbag study. *Zemdirbyste-Agriculture*. 99: 227-236.
- Loaiza-Usuaga J.C., J.D. León-Peláez, M.I. González-Hernández, J.F. Gallardo-Lancho, W. Osorio-Vega y G. Correa-Londoño. 2013. Alterations in litter decomposition patterns in tropical montane forests of Colombia: a comparison of oak forests and coniferous plantations. *Can. J. For. Res.* 43: 1-6.
- Lobo, D., Peña, Y., Lozano, Z. y Hernández, R. 2013. Micronutrientes en agregados de un suelo de sabana, bajo un sistema maíz-ganado mejorado. *Venezuelas* 20: 41-52.
- López, D.M. y Estrada, M.H. 2015. Propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Bioagrocencias*. 8: 3-11.
- Macías, M.A. y Valenzuela, Z.A. 2009. El tequila en tiempos de la mundialización. *Comercio Exterior*. 59: 459-472.
- Martínez-Aguilar, F.B., Guevara-Hernández, F., Aguilar-Jiménez, C.E., Rodríguez-Larramendi, L.A., Reyes-Sosa, M.B. y La O-Arias, M.A. 2020. Caracterización físico-química y biológica del suelo cultivado con maíz en sistemas convencional, agroecológico y mixto en la Frailesca, Chiapas. *Terra Latinoamericana* 38: 871-881.
- Medina, L.M.S., Quintero, L.R., Espinosa, V.D., Alarcón, A., Etchevers, B.J.D., Trinidad, S.A. y Conde, M.F.V. 2018. Generación de un inoculante acelerador del compostaje. *Rev Argent Microbiol*. 50: 206-210.
- Monsalve, C.O., Gutiérrez, D.J. y Cardona, W.A. 2017. Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo. Una revisión. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 11: 200-209.
- Muñoz, C.C. y Morales, P.R. 2018. Generación de residuos orgánicos en las unidades económicas comerciales y de

- servicios en la Ciudad de México. Estudios demográficos y urbanos. 33: 733-767.
- Muñoz-Villalobos, J.A., Nava-Reyna, E., Cerano-Paredes, J., Constante-García, V., Inzunza-Ibarra, M.A. y Macías-Rodríguez, H. 2021. Dinámica del nitrógeno y el carbón orgánico en el proceso de descomposición de una composta con estiércol de bovino y residuos de cosecha. *Journal of Environmental and Agroecological Sciences*. 4: 19-26.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. [Consultado 27 Julio 2020] 2002. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- Novita, E. 2016. Biodegradability simulation of coffee wastewater using instant coffee. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 9: 217-229.
- Oda, M. y Sukchan, U. 2021. Crop production under nitrogen starvation conditions: relationships with applied organic matter and soil microbial biomass [version 2; peer review: 2 not approved]. *F1000Research*. 9: 1-14.
- Olson, J.S. 1963. Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecology*. 44: 322-331.
- Ramírez, C.C, Alonso, G.M. y Rigal, L. 2012. Valorización de residuos agroindustriales del tequila para alimentación de rumiantes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18: 449-457.
- Rodrigues, dS.L., Feitosa, dS.T., Klestadt, L.L., Freitas, H. y Costa, C.M. 2022. Decomposition Rate of Organic Residues and Soil Organisms' Abundance in a Subtropical *Pyrus pyrifolia* Field. *Agronomy*. 12: 263.
- Rodríguez, M.R., Alcántar, G.E., Íñiguez, C.G., Zamora, N.F., García, L.P., Ruiz, L.M. y Salcedo, P.E. 2010. Caracterización física y química de sustratos agrícolas a partir de bagazo de agave tequilero. *Interciencia*. 35: 515-520.
- Rousk, J., y Bengtson, P. 2014. Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Frontiers in microbiology*. 5: 1-3.
- Salazar, L.A.M., Ordoñez, G.C.A., Hernández, S.D., Castaño, P.L.M., Peña, P.K., Rodríguez, N.J.R. y Bueno, L.L. 2014. Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Scientia Et Technica*. 19: 223- 229.
- Sánchez, S.A. 2016. Necesidades de información y comportamiento informativo de los agricultores de agave azul de Tequila, Jalisco: un estudio de caso. *Investigación Bibliotecológica*. 30:143-178.
- Saval, S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Bio-Tecnología*. 16: 14-46.
- Servicio Meteorológico Nacional-Comisión Nacional del Agua (SMN-CONAGUA-2018). [Consultado el 15 de noviembre de 2020] 2018. Disponibles en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/>.
- Sollins, P., Homann, P. y Caldwell, B. 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*. 74: 65-105.
- Statgraphics, C. 2014. Statgraphics Centurion XVII. User Manual. Version, 17 (8.0). Herndon, USA.
- Suvain, K.K., Paulpandi, V.K., Srinivasan, G., Subramanian, E., Indirani, R. y Prabakaran, K. 2021. Evaluating the incorporation method of crop residues and its impact on soil biological and chemical properties through decomposition. *The Pharma Innovation Journal*. 10: 1667-1671.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. y Boerjan, J. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. 153: 895-905.
- Vargas, C.Y.A. y Pérez, P.L.I. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 14: 59-72.
- Villavicencio-Enríquez, L. 2012. Producción, pérdida de peso y tasas de descomposición de hojarasca en cafetales tradicional y rústico, y selva mediana, en Veracruz, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18: 159-173.
- Vos, V.C., van Ruijven, J., Berg, M.P., Peeters, E. y Berendse, F. 2013. Leaf litter quality drives litter mixing effects through complementary resource use among detritivores. *Oecologia* 173: 269-80.
- W.R.B. 2015. World reference base for soil resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps World Soil Resources Reports No. 106, F.A.O., Roma.

Rendimiento y composición química de *Panicum maximum* cv. Tanzania en un sistema silvopastoril en Chiapas

Yield and chemical composition of *Panicum maximum* cv. Tanzania in a silvopastoral system in Chiapas

Esau de Jesús Pérez-Luna¹, Benigno Ruíz-Sesma², Yazmin Sánchez-Roque³, Miguel Ángel Canseco-Pérez⁴, Yolanda del Carmen Pérez-Luna^{3*}

¹ Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), Facultad de Ciencias Agronómicas, Carretera Ocozacoautla-Villaflores km. 84.5, Chiapas, C.P. 30470 México, Email: eperezl@unach.mx

² Universidad Veracruzana, Facultad de Ingeniería en Sistemas de Producción Agropecuaria. Carretera Costera del Golfo km 220, Col. Agrícola Micahapan. C.P. 96100. Email: ruizsb71@gmail.com

³ Universidad Politécnica de Chiapas. Programa de Ingeniería Agroindustrial. Carretera Tuxtla Gutiérrez - Portillo Zaragoza Km 21+500, Las Brisas, Chiapas, C.P. 29150 México. Email: yperez@upchiapas.edu.mx

⁴ Dirección de Investigación, Evaluación y Posgrado. Universidad Tecnológica de Tlaxcala, Carretera al Carmen Xalpatlahuaya s. n. El Carmen Xalpatlahuaya, Huamantla, Tlaxcala, México. Email: miguel.canseco@uttlaxcala.edu.mx

RESUMEN

Para evaluar el efecto de la incorporación de *L. leucocephala* sobre la producción de biomasa y la composición química de *P. maximum* cv. Tanzania en un sistema silvopastoril, se estableció un experimento en dos praderas, establecidas con *P. maximum* cv. Tanzania como único cultivo en una de ellas y en la otra asociada con *L. leucocephala* en un arreglo de pasturas en callejones. En cada pradera fueron colocadas 12 jaulas de exclusión de 1 m³ en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 4, dos sistemas (monocultivo y silvopastoril) y cuatro fechas de corte (28, 56, 84 y 112 d) y tres repeticiones. Se aplicó una fertilización química con Fosfonitrato en cada una de las jaulas de exclusión para ambos tratamientos. Se observó diferencia significativa entre sistemas para las variables altura, cobertura, producción de materia orgánica (kg/ha), producción de proteína cruda (kg/ha) y el porcentaje de FDN, reportando los mejores valores el sistema silvopastoril. Se concluye que el uso de la *Leucaena* ofrece ventajas importantes si se considera que es capaz de producir alimento de alto valor nutricional para los animales, además, mejora la calidad y cantidad de forraje del sistema.

Palabras clave: biomasa, *Leucaena leucocephala*, *Panicum maximum*, sistema silvopastoril,

ABSTRACT

To evaluate the effect of *L. leucocephala* incorporation on *P. maximum* cv. Tanzania biomass production and chemical composition of in a silvopastoral system, an experiment was established in two grasslands, established with *P. maximum* cv. Tanzania as the only crop in one of them and in the other, associated with *L. leucocephala* in an arrangement of pastures in alleys. In each meadow, 12 exclusion cages of 1 m³ were placed in a completely random design with a 2 x 4 factorial arrangement, two systems (monoculture and silvopastoral) and four cutting dates (28, 56, 84 and 112 d) and three repetitions. Chemical fertilization with Phosphonitrate was

applied in each of the exclusion cages for both treatments. A significant difference was observed between systems for the variables height, coverage, production of organic matter (kg/ha), production of crude protein (kg/ha) and the percentage of FDN, reporting the best values of the silvopastoral system. It is concluded that the use of *Leucaena* offers important advantages if we consider its capability for producing food of high nutritional value for animals, as well as it improving the forage quality and quantity of the system.

Key words: biomass, *Leucaena leucocephala*, *Panicum maximum*, silvopastoral system

INTRODUCCIÓN

La base de la ganadería tropical en América Latina es el pastoreo extensivo el cual implica la utilización de extensas áreas de pastizales, frecuentemente degradadas y de baja productividad especialmente durante los prolongados períodos secos. Estas condiciones provocan, en muchas ocasiones, bajos coeficientes técnicos y pobre desempeño económico de las explotaciones ganaderas (Rivas, 2002). Sin embargo, mientras el área de pasturas en América Latina ha aumentado durante los últimos años, la producción de rumiantes se ha expandido con bajo crecimiento de su productividad (Arana, 2009).

En el trópico mexicano, la ganadería se desarrolla en sistemas de alimentación cuya base son las gramíneas. Uno de los problemas más importantes que limitan la productividad de las explotaciones ganaderas en las regiones tropicales es el manejo inadecuado de las praderas (que en la mayoría de los casos reciben una carga animal superior a la capacidad de carga) y la ineficiente administración del forraje producido y posteriormente el sobrepastoreo (Pérez et al., 2012). Esta baja productividad ganadera es el resultado de diversos factores, entre ellos destacan la dominancia de pasturas de especies nativas de baja calidad y productividad y las prácticas inadecuadas de manejo de potreros (Szott et

*Autor para correspondencia: Yolanda del Carmen Pérez Luna
Correo electrónico: yperez@upchiapas.edu.mx

Recibido: 17 de octubre de 2022
Aceptado: 23 de febrero de 2023

al., 2000); ambas producen como consecuencia que una alta proporción de estas pasturas se encuentren en diferentes estadios de degradación, lo que a la vez provoca que soporten cargas animales muy bajas. Se reporta que, para América Central, aproximadamente entre 50 y 80 % de las pasturas se encuentran degradadas y que soportan cargas animales inferiores hasta en un 40 % en relación a pasturas con un manejo apropiado (CATIE, 2002).

Uno de los factores que han limitado la obtención de mejores índices productivos en la ganadería es el bajo valor nutritivo de los forrajes, debido principalmente al manejo inadecuado de las praderas que generalmente se utilizan con una carga animal superior a su capacidad forrajera; aunado a esto, la prevalencia de los sistemas extensivos donde generalmente se utiliza una sola especie forrajera, cuyo aporte de proteína cruda no alcanza a cubrir los requerimientos mínimos diarios de mantenimiento del animal. Por otra parte, se aprecian severas deficiencias nutricionales en el suelo; es por ello que, para contrarrestar estos efectos, en la actualidad se recomienda la incorporación de árboles con potencial forrajero, generalmente leguminosas que permite enriquecer por un lado la dieta de los animales como una fuente de nitrógeno complementario y mejorar las condiciones físico-químicas de los suelos de uso ganadero. Al respecto, los sistemas silvopastoriles actualmente están cobrando importancia en los sistemas ganaderos, debido a los múltiples beneficios que de ellos se obtienen, con el propósito de realizar una ganadería sustentable y lograr la rehabilitación de las praderas que se encuentran en un avanzado estado de degradación. Dentro de las especies más utilizadas en sistemas silvopastoriles se encuentra *L. leucocephala*, conocida tradicionalmente como huaje, dicha especie es considerada como una de las más prometedoras debido a sus características morfológicas y fisiológicas que, junto a la asociación con las gramíneas, particularmente con *P. maximum*, se observa una interacción positiva entre los componentes que integran el sistema.

Los sistemas de producción ganadera (leche, carne y doble propósito) son de suma importancia para la producción de proteína de origen animal destinada al consumo humano. En este sentido, se requiere desarrollar investigaciones con rigor científico que permita generar información confiable y que contribuya a la solución de la problemática que atraviesa la ganadería en el Estado de Chiapas. Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de incorporar *L. leucocephala* sobre la producción de biomasa y el valor nutritivo de *P. maximum* cv. Tanzania, en un sistema silvopastoril, partiendo de que la incorporación de árboles forrajeros en praderas establecidas con este pasto mejora el rendimiento de biomasa y el valor nutritivo en dichos sitios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo experimental se realizó en el Centro Agropecuario de Capacitación y Desarrollo sustentable S. P. R. de R. L. (CA-CyDS), en el municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas, México; situado entre los 16° 42' de latitud norte y 93° 00' de longitud

oeste, a una altitud de 420 msnm, con un clima cálido subhúmedo, una precipitación media anual de 990 mm y una temperatura promedio de 26° C (INEGI, 2003).

Sitio experimental

Se utilizaron dos parcelas de una superficie aproximada de una ha, establecidas con *P. maximum* cv. Tanzania como único cultivo en una de ellas y en la otra asociada con *L. leucocephala* en un arreglo de pasturas en callejones, donde la arbustiva fue establecida a siete metros de distancia entre hileras y 2 m entre árboles; las hileras de árboles fueron establecidas de oriente a poniente con el propósito de permitir la mayor entrada de la luz solar a la gramínea durante el día y no afectar su desarrollo.

En cada parcela se establecieron 12 jaulas de exclusión de 1 m³, construidas con madera y malla pollitera, haciendo un total de 12 jaulas para cada sitio experimental (monocultivo vs silvopastoreo), las cuales fueron distribuidas al azar.

Se realizó un chapeo manual cortando el forraje a una altura de 15 cm del suelo, con el propósito de uniformizar la pradera y lograr un rebrote uniforme. Enseguida se aplicó una fertilización química con Fosfonitrato (33-03-00) en cada una de las jaulas de exclusión para ambos tratamientos. El pasto fue cosechado en cuatro intervalos de 28 d, considerando las particularidades del diseño experimental.

Variables evaluadas

Producción de biomasa

La producción de biomasa se obtuvo cortando el forraje de cada una de las jaulas de exclusión para cada uno de los tiempos de evaluación, una vez obtenida la muestra, ésta fue pesada en una balanza granataria para determinar la biomasa por m², posteriormente fue enviada al laboratorio para su respectivo análisis.

Producción de materia seca (MS)

Se analizaron muestras representativas de material vegetativo de cada uno de los tratamientos (500 g) y sus respectivas repeticiones, las cuales fueron pesadas y depositadas en bolsas de papel estraza debidamente identificadas. Las muestras fueron introducidas a una estufa a 60 °C durante 48 h hasta alcanzar peso constante.

Relación hoja-tallo

Se separaron los componentes morfológicos de la planta (hoja, tallo, material muerto, leguminosas), posteriormente, fueron pesados de manera individual. Una vez obtenido el registro de peso de cada componente, se dividió el peso obtenido de hoja entre el peso de tallos, obteniendo de esta manera la relación entre estos componentes.

Altura decumbente

Se determinó mediante una medición al azar de la altura de la planta para cada uno de los tratamientos, tomando en cuenta cinco valores de la planta, para tener una altura promedio del pasto en cada uno de los tratamientos.

Cobertura

Se determinó mediante la división de manera imaginaria de cada jaula, dividiéndola en cuatro partes (25, 50, 75 o 100 %, respectivamente), asignando un porcentaje de cobertura de acuerdo a lo observado.

Análisis químico proximal

Las muestras de cada tratamiento fueron colectadas, secadas y molidas, y enviadas al Laboratorio de Bromatología del Colegio de la Frontera Sur. Para los análisis de materia seca (MS), las muestras fueron colocadas en un horno de aire forzado a una temperatura de 60 °C por 48 h, Materia orgánica (MO) por la combustión de las muestras en mufla a 600 °C durante 6 h, proteína cruda (PC) determinado por el método de Kjeldahl (CP, AOAC, 1996; ID 954.01), Fibra detergente neutra (FDN) y Fibra detergente ácida (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991)

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4, dos sistemas (silvopastoril y monocultivo) y cuatro fechas de corte (28, 56, 84 y 112 d de rebrote) y tres repeticiones para cada tratamiento, formando un total de 24 unidades experimentales

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del sistema (silvopastoril vs monocultivo) sobre las variables Altura cm, Cobertura %, Relación Hoja:Tallo, Biomasa T/ha, Producción de MS T/ha, Producción MO kg/ha, Producción PC kg/ha, % FDN, % PC y % MO, se analizó mediante una prueba de T de Student utilizando como covariable las cuatro fechas de corte (28, 56, 84 y 112 d). Para observar la diferencia estadística entre factores y sus interacciones, se utilizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar con arreglo factorial, el factor A correspondió al sistema silvopastoril y monocultivo y el factor B a las fechas de corte 28, 56, 84 y 112 d. Para la comparación de medias de los tratamientos de las variables evaluadas se utilizó la prueba de Tukey. Para encontrar la diferencia estadística entre las fechas de corte entre los sistemas, se utilizó la prueba de contrastes ortogonales en cada una de las variables evaluadas (Steel *et al.*, 1997). Los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS V9.0 (SAS, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de Biomasa de *P. maximum* cv. Tanzania

En las figuras 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos de la producción de biomasa en verde y seco (t/ha) de *P. maximum* cv. Tanzania, donde se puede observar un incremento lineal conforme aumenta la edad de la gramínea. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre sistemas monocultivo y silvopastoril para la variable producción de biomasa en verde y seco; sin embargo, el día de corte 56, presenta diferencia significativa ($P = 0.027$) con valores de 47.7 y 26.20 t/ha para el sistema silvopastoril y monocultivo respectivamente, pero para el día de corte 112, el comportamiento se invierte con diferencia estadística

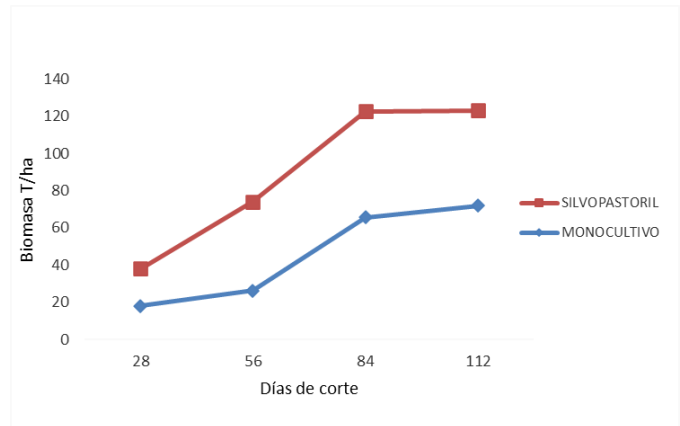


Figura 1. Producción de biomasa de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo.

Figure 1. Biomass production of *P. maximum* cv. Tanzania in monoculture vs silvopastoral.

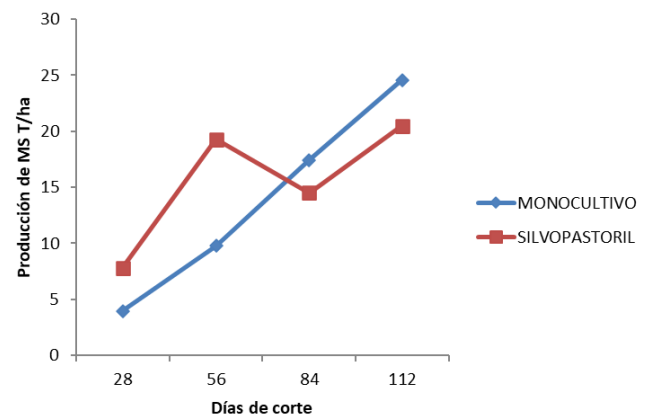


Figura 2. Producción de materia seca de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo.

Figure 2. Dry matter production of *P. maximum* cv. Tanzania in monoculture vs silvopastoral.

significativa ($P = 0.032$) con valores de 71.80 y 51.20 t/ha para el sistema monocultivo y silvopastoril. En lo que respecta a la variable producción de MS el sistema silvopastoril superó con diferencia estadística significativa ($P = 0.007$) al sistema monocultivo con valores de 19.19 t/ha vs 9.77 t/ha.

Durante las dos primeras etapas de crecimiento de la gramínea (28 y 56 d) se observó un mayor rendimiento en el sistema silvopastoril; sin embargo, el día de corte 84 y 112 presenta una disminución de la producción de biomasa y MS, el efecto observado puede deberse a la competencia por luz que se dio cuando el pasto se asoció con la especie arbustiva, ya que la especie arbustiva alcanza su pico de crecimiento de follaje a los 75 d después del corte, razón por la cual el pasto en este sistema presentó este comportamiento no lineal no observado en el sistema monocultivo. En el sistema silvopastoril en las primeras etapas, a medida que la gramínea fue creciendo ésta demostró un efecto positivo en su desarrollo, seguramente por el aprovechamiento del nitrógeno y otros nutrientes que fueron aportados por la especie arbustiva. Otro aspecto importante de señalar es que el pasto a medida

que cambia su fenología, tiende acumular carbohidratos estructurales y compuestos secundarios (celulosa, hemicelulosa, lignina y algunas pectinas), además, en los meses lluviosos permite que el agua absorbida en el suelo mueva los nutrientes con mayor facilidad, siendo estos más solubles para que la planta los pueda obtener a través de su sistema radicular; por su parte, la luminosidad es otro factor importante que beneficia a esta especie de gramínea considerada como de ciclo C_4 . Comparando los resultados encontrados en este trabajo con otros reportes, la mayor producción de biomasa en verde podría deberse a diversos factores, tales como intensidad solar, fertilización, entre otras. En este sentido, Encinozo *et al.* (2017), mencionan que la sombra o diferentes niveles de sombra de árboles o arbustos puede provocar variaciones en la producción de biomasa, mayor contenido de proteína cruda y una reducción de los carbohidratos estructurales. Los resultados encontrados en este estudio coinciden con los reportados por Pineda-Doportó *et al.* (2019), donde mencionan que la producción forrajera, componentes forrajeros como es la altura de la planta de *B. brizantha* no es afectada por el sistema de cultivo ($P > 0.05$), reportando valores de producción forrajera de 1.76 vs 1.74 t MS/Ha en monocultivo y bajo sistema silvopastoril de árboles dispersos en potrero.

Por su parte, Pezo e Ibrahim (1999) mencionan que los cambios morfológicos y fenológicos que ocurren en las especies forrajeras cuando están creciendo en altos niveles de sombra tienden a comprometer su potencial de persistencia y, por ende, su productividad; por ello, el manejo de los cortes debe ser muy cuidadoso. Por consiguiente, el manejo adecuado de la sombra es un aspecto fundamental en los sistemas de cultivo en callejones y para aminorar su efecto negativo se recomienda realizar podas frecuentes a los árboles.

La modificación de la luz tiene una marcada incidencia en el desarrollo de los pastos y en los ambientes cálidos y secos del trópico. Las gramíneas C_4 son su componente principal, sin embargo, aun en estas especies, el exceso de luz provocado por el aumento de la intensidad luminosa puede constituir un estrés ambiental y predisponer a las hojas a sufrir daños, al no poder disipar la energía incidente de una forma adecuada. Dada esta situación propia de las zonas sin cobertura forestal surge la necesidad de introducir árboles en las áreas ganaderas, donde el uso de las leguminosas arbóreas y las gramíneas mejoradas desempeñan un papel muy importante en la alimentación del ganado y el mantenimiento del ecosistema en general. Asimismo, cabe mencionar que la especie *P. maximum cv. Tanzania*, se caracteriza por poseer una alta producción de biomasa, ya que del volumen total de la planta el 80 % son hojas.

El comportamiento del rendimiento en este estudio es similar a los obtenidos por Padilla (2002), quien logró el mayor redimiendo a edades posteriores a los 75 d de rebrote. Asimismo, estos resultados son satisfactorios si se toma en cuenta los beneficios que se obtienen con la presencia de árboles dentro del sistema, que además de tener buena pro-

ducción de biomasa, también se logra generar un ambiente óptimo para los animales que pastan dentro del mismo.

Relación Hoja-Tallo de *P. maximum cv. Tanzania*

La relación hoja:tallo no presentó diferencia estadística entre sistemas silvopastoril y monocultivo, tampoco se observó diferencias estadísticas significativas entre días de corte (Tablas 1 y 2). La importancia de conocer la cantidad de hojas que la especie puede tener en comparación del tallo es de vital importancia, puesto que el valor nutritivo de la planta se concentra en una mayor producción de hojas; a su vez, ésta es de mayor palatabilidad para el consumo de los rumiantes, por su parte, Pineda-Doportó *et al.* (2019) reportan resultados similares a los encontrados en este estudio, mencionando que la disponibilidad de hojas y tallos fue similar en ambos sistemas silvopastoril y monocultivo; asimismo, concuerdan con lo reportado por Cruz-Sánchez (2018) donde evaluaron dos intensidades de cosecha (severo y ligero) y dos frecuencias de cosecha (21 y 28 d) sin encontrar diferencias estadísticas significativas para esta variable, comportamiento similar reporta Alvarado-Canché *et al.* (2022), al no encontrar diferencias estadísticas significativas para la relación hoja tallo del pasto *C. plectostachyus* en el sistema monocultivo vs sistema silvopastoril.

Lo anterior no concuerda con los resultados de Páez *et al.* (1997), quienes afirmaron que el sombreado incrementa el área específica y reduce el peso de la hoja. La realidad es que el porcentaje de hojas es un indicador relativo y que cualquier variación de la intensidad luminosa que favorezca o reduzca el peso total, no tiene por qué afectar la relación si incide por igual en las hojas y los tallos como se observa en los resultados obtenidos en este estudio. En este sentido Lok (2005) menciona que la presencia de árboles en el estrato herbáceo ejerce una favorable influencia, ya que una de las ventajas que estos tienen es la creación de un microclima favorable que realiza la acción combinada con la radiación

Tabla 1. Efecto del sistema de monocultivo vs silvopastoreo en la producción de biomasa y composición química *P. maximum cv. Tanzania*.

Tabla 2. Efecto del sistema de monocultivo vs silvopastoreo y días de corte en la producción de biomasa y composición química *P. maximum cv. Tanzania*

VARIABLE	SISTEMA		Valor de P
	MONOCULTIVO	SILVOPASTORIL	
Biomasa T/ha	45.4	43.7	0.4186
Prod MST/ha	13.94	15.02	0.4186
Rel hoja:tallo	3.15	2.43	0.494
Altura cm	106.23 ^b	125.79 ^a	0.0075
Cobertura %	60.42 ^a	43.75 ^b	0.02
Prod MO kg/ha	1870.2 ^b	2516.1 ^a	0.037
Prod PC kg/ha	969.61 ^b	1557.3 ^a	0.0002
% MO	13.99	16.01	0.087
% PC	7.06 ^b	10.47 ^a	0.016
% FDN	72.00 ^a	68.92 ^b	0.011
% DIVMS	69.10	77.74	0.171

Filas con distintas literales difieren estadísticamente. Prueba de T usando como covariables días de corte.

solar haciendo también que los vientos sean menores sobre este, lo cual favorece la mayor conservación de la humedad y mejora ecológicamente las condiciones del pastizal.

Altura de *P. maximum* cv. Tanzania

La variable altura de corte en cm presentó diferencia estadística ($P=0.0075$) entre sistemas, con 125.79 vs 106.23 para silvopastoril y monocultivo, respectivamente, de igual manera, los días de corte 84 y 112 marcaron diferencias significativas ($P=0.040$ y $P=0.009$) con valores de 151.3 vs 127.0 y 156.3 vs 123.0 para silvopastoril y monocultivo correspondientemente (Tabla 1 y 2). El mayor crecimiento del pasto encontrado en el sistema silvopastoril se debe a la competencia que existió por la radiación solar entre la leguminosa y la gramínea, en este sentido, Smethurst *et al.* (2017) mencionan que el efecto de la sombra de las leñosas sobre las gramíneas puede ser diversas ya que deben mantener un balance de carbono que requieren para la producción y crecimiento de las hojas. Asimismo, Santiago-Hernández *et al.* (2016) comentan que las hojas de las gramíneas bajo sombra tienen una apariencia alargada y delgada en comparación con las hojas que se encuentran expuestas directamente al sol; lo primero, les ayuda a incrementar su habilidad competitiva para interceptar la luz, mientras que lo segundo les permite reducir su tasa de respiración y por consecuencia la actividad fotosintética disminuye bajo condiciones de sombra. La baja intensidad de luz reduce los procesos fotosintéticos y retrasa la maduración del tejido, la degradación de los cloroplastos y este proceso retarda la senescencia de las gramíneas y mantiene mayor calidad nutritiva (Obispo *et al.*, 2008). La productividad de las gramíneas kg de materia seca y composición química, están en función de la disponibilidad de luz, cuando la humedad, la temperatura y los nutrientes no son limitantes (Guenni *et al.*, 2008).

Al comenzar las lluvias y aumentar la temperatura se produce un enérgico crecimiento del pasto (junio) observándose una caída en julio, debido al parecer, a una disminución prematura de las precipitaciones (periodo intraestival) y una recuperación fisiológica de la planta. En los meses sucesivos el crecimiento se incrementa hasta octubre, a partir del cual éste comienza a disminuir. La fluctuación observada en el desarrollo de la planta está estrechamente relacionada con el rendimiento de forraje en los diferentes meses del año (Figura 3).

En cuanto a la variable altura de las plantas, se observó que hubo una marcada diferencia entre los tratamientos, con incremento en el silvopastoreo (37 % mayor), contrario a lo que reportan Toledo y Fisher (1989). Existe un crecimiento constante en ambos sistemas (silvopastoreo y monocultivo) manteniendo el nivel de altura similar en los tratamientos con 84 y 112 d de rebrote. Las diferencias estadísticas observadas para la variable altura entre ambos sistemas, parece estar relacionado con las sustancias reguladoras del crecimiento, al respecto Dillewijn (1973), menciona que bajo los efectos de la reducción de la luz dichas sustancias estimulan la elongación del tallo e impiden que se desarrollen las yemas

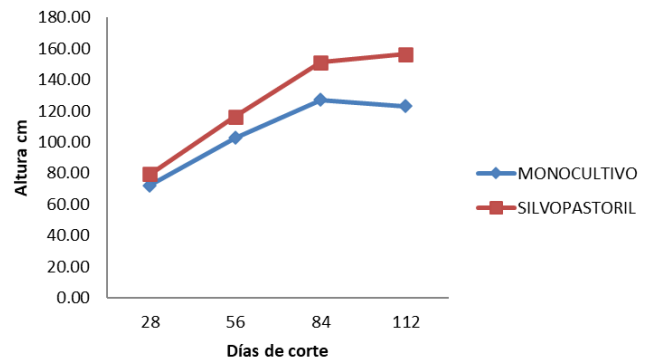


Figura 3. Altura de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo. Figure 3. *P. maximum* cv. Tanzania height in monoculture vs silvopastoral.

laterales. En este sentido, Wong y Wilson (1980) encontraron que la sombra hasta 40 y 60 % aumentó el rendimiento de los brotes de *P. maximum* en 30 y 27 %, respectivamente.

Cobertura de *P. maximum* cv. Tanzania

La variable cobertura observada en este estudio, presentó diferencias estadísticas significativas ($P = 0.020$) entre sistemas con valores de 60.42 % para monocultivo y 43.75 %, para silvopastoril, respectivamente. El 27 % de menor cobertura que presentó el sistema silvopastoril se ve compensado con el 8.5 % más de MS y 15.2 % de altura que presentó este sistema en comparación con el monocultivo. No se encontró diferencia significativa entre fechas de corte (Tabla 1 y 2).

La importancia de la cobertura del pastizal es que de este depende la cantidad de forraje a ofrecer a los animales para su alimentación. El *P. maximum* es de crecimiento amacollado, lo cual ofrece al suelo protección de la erosión y escorrentía como consecuencia de las altas precipitaciones. Los resultados muestran un crecimiento lineal, favoreciendo a una mayor cobertura en el sistema monocultivo, esto puede deberse a la cantidad de radiación solar recibida, en

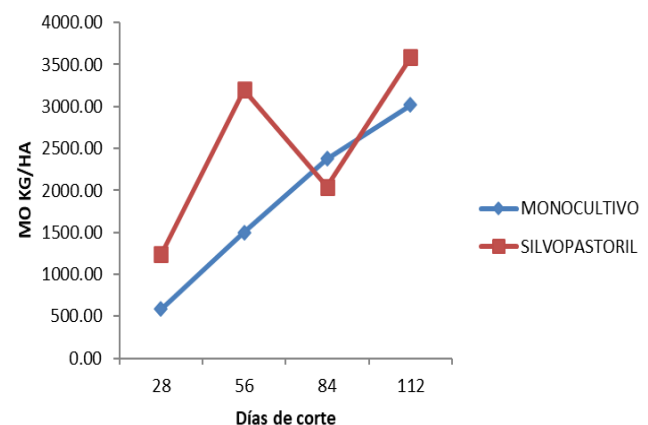


Figura 4. Producción de materia orgánica de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo.

Figure 4. Organic matter production of *P. maximum* cv Tanzania in monoculture vs silvopastoral.

este contexto, Nanami *et al.* (2011) afirma que en una comunidad de plantas, las interacciones competitivas ocurren cuando dos o más se encuentran asociadas y las capacidades de sobrevivencia y crecimiento de una o de ambas se ven reducidos; más aún, estos se encuentran limitados por los recursos como luz, agua y nutrientes y pueden encontrarse en condiciones restringidas en el mismo tiempo y espacio, coincidiendo con estos investigadores, Medinilla-Salinas *et al.* (2013) mencionan que la interacción aérea entre gramíneas, árboles y arbustos se asocia principalmente a la radiación solar, ya que las plantas requieren de este recurso para la producción de biomasa en el sistema.

Sánchez *et al.* (2007) realizaron estudios sobre la acumulación de hojarasca de *P. maximum* en silvopastoreo y observaron que esta especie forrajera acumuló una menor cantidad de hojarasca durante el período junio-diciembre, etapa en la que se produce su mayor desarrollo vegetativo, siendo la lluvia el factor climático que mayor correlación negativa presentó. Lo anterior confirma el efecto que puede provocarse en el sistema si se rompe la interacción ambiente-estrato herbáceo-árboles; siendo éste un efecto positivo o negativo en la producción. Según Crespo y Fraga (2006) mencionan actualmente no hay duda de la importancia que tiene la hojarasca para la estabilidad y el funcionamiento del ecosistema, pues constituye la fuente principal de circulación de materia orgánica, energía y nutrimentos entre las plantas y el suelo.

Composición química y DIVMS de *P. maximum* cv. Tanzania

En lo referente a la composición química del *P. maximum* cv. Tanzania en los dos sistemas (Figura 5 y 6; Tabla 1 y 2) se observa que no existe diferencia significativa en el contenido de MO con valores de 13.99 % vs 16.01 % para monocultivo y silvopastoril, respectivamente. Sin embargo, al convertir la MO en kg/ha se observa que existe diferencia estadística significativa ($P = 0.001$) entre los sistemas al día de corte 56 con valores de 3200.89 kg/ha vs 1499.12 kg/ha para silvopastoril y monocultivo, respectivamente. El 13 % más de MO que produce el sistema silvopastoril, aunado al incremento en producción de MS y altura, logra un 53 % más de producción de MO en comparación con el monocultivo.

La proteína cruda incrementó un 33.14 % en el sistema silvopastoril, encontrándose diferencia estadística significativa ($P = 0.016$) con valores de 10.47 vs 7.06 % para el sistema silvopastoril y monocultivo, respectivamente. La conversión de % de PC a kg/ha, proporciona un indicador más preciso sobre la disponibilidad de este nutriente, en este sentido se encontró diferencia estadística significativa ($P = 0.020$, $P = 0.012$) entre sistemas para los días de corte 28 y 56, con valores 1010.53 vs 271.09 y 1569.74 vs 794.51 kg/ha para silvopastoril y monocultivo, respectivamente. En lo que respecta a la concentración de carbohidratos estructurales, se encontró una reducción del 4.3 % de FDN en el sistema silvopastoril, presentando diferencia estadística significativa ($P = 0.011$) entre sistemas, con valores de 68.92 vs 72.00 %

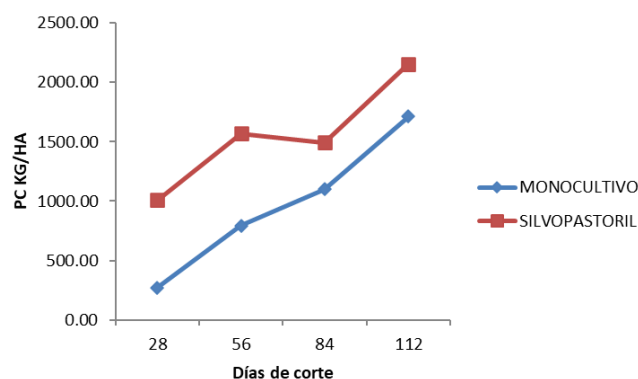


Figura 5. Producción de proteína cruda de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo.

Figure 5. Crude protein production of *P. maximum* cv. Tanzania in monoculture vs silvopastoral.

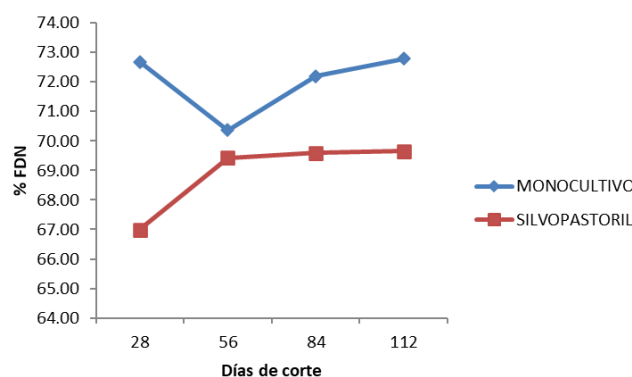


Figura 6. Porcentaje de fibra detergente neutro de *P. maximum* cv. Tanzania en monocultivo vs silvopastoreo.

Figure 6. Percentage of neutral detergent fiber of *P. maximum* cv. Tanzania in monoculture vs silvopastoral.

de FDN para silvopastoril y monocultivo, respectivamente. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) no presentó diferencia estadística significativa con valores de 69.1 % y 77.74 % para el sistema monocultivo y silvopastoril, respectivamente.

Los resultados encontrados coinciden con lo mencionado por Romero *et al.* (2020) al evaluar tres niveles de sombra en una pradera de *P. maximum* Jacq., concluyen que los altos contenidos de PC en los pastizales bajo la copa de los árboles podrían estar asociados con un aumento del flujo de nitrógeno en el suelo, especialmente cuando la especie arbórea es una leguminosa que tiene potencial para contribuir a la fijación biológica de N. Además, los pastos bajo sombra son fisiológicamente más jóvenes que los pastos a pleno sol (Xavier *et al.*, 2014). Por otro lado, los resultados encontrados difieren de lo reportado por Alvarado-Canché *et al.* (2022), en donde evaluaron los sistemas silvopastoril y monocultivo, encontrando que los niveles de PC de *C. nlemfuensis* fueron similares estadísticamente con 94 y 112 kg/ha para monocultivo y silvopastoril, respectivamente. Por su parte, Santiago-Hernández *et al.* (2016) reportan un valor promedio de 8.8 %

Tabla 2. Efecto del sistema de monocultivo vs silvopastoreo y días de corte en la producción de biomasa y composición química de *P. maximum* cv. Tanzania.**Table 2.** Effect of the monoculture vs silvopastoral systems and cutting days on biomass production and chemical composition of *P. maximum* cv. Tanzania.

VARIABLE	SISTEMA								NIVEL DE SIGNIFICANCIA			
	MONOCULTIVO				SILVOPASTORIL							
Días de corte	28	56	84	112	28	56	84	112	28	56	84	112
Biomasa T/Ha	18.23	26.20^b	65.57	71.80^a	19.20	47.7^a	57.00	51.20^b	NS	0.027	NS	0.032
Prod MS/Ha	3.97	9.77^b	17.44	24.57	7.83	19.19^a	14.51	20.48	NS	0.007	NS	NS
Rel Hola:Tallo	3.71	2.43	3.07	3.38	4.78	1.87	1.28	1.80	NS	NS	NS	NS
Altura Cm	72.10	102.80	127.0^b	123.0^b	79.43	116.20	151.3^a	156.3^a	NS	NS	0.040	0.009
Cobertura %	58.33	66.67	58.33	58.33	41.67	50.00	33.33	50.00	NS	NS	NS	NS
Prod MO Kg/Ha	583.51	1499.12^b	2378.92	3019.28	1236.93	3200.89^a	2041.06	3585.69	NS	0.001	NS	NS
PROD PC Kg/Ha	271.09b	794.51^b	1100.51	1712.32	1010.53a	1569.74^a	1492.72	2156.33	0.02	0.012	NS	NS
% MO	14.68	15.34	13.64	12.29	15.79	16.68	14.07	17.51				
% PC	6.82	8.13	6.31	6.97	12.90	8.18	10.29	10.53				
% FDN	72.68	70.36	72.20	72.78	66.99	69.43	69.59	69.66				
% DIVMS	73.89	71.17	62.25	ND	78.73	70.68	83.81	ND				

Filas con distintas literales difieren estadísticamente. Nivel de significancia de los contrastes ortogonales entre sistemas por días de corte.

de PC en un trabajo donde asocio leguminosas y gramíneas sin encontrar diferencias significativas. Resultados similares reportan Canul-Solis *et al.* (2018) al no encontrar diferencia significativa entre sistemas silvopastoril y monocultivo sobre el contenido de PC y FDN en *C. nlemfuensis*, al evaluar la asociación de *T. diversifolia*, *G. sepium*, *C. nlemfuensis*.

La reducción significativa del 4.3 % de FDN encontrada en el sistema silvopastoril, difiere de lo mencionado por Alvarado-Canché *et al.* (2022), en donde reportan valores de 785.8 y 847.6 kg/ha para el sistema monocultivo y silvopastoril, sin encontrar diferencia significativa, del mismo modo, Medinilla-Salinas *et al.* (2013) no observaron diferencia significativa en el contenido de PC y FDN de *M. maximum* asociado con *G. sepium* en un sistema silvopastoril. Por otro lado, Paciullo *et al.* (2016) mencionan que existe una mejora en el contenido de MO, PC y FDN de las gramíneas en los sistemas silvopastoriles, coincidiendo con los resultados encontrados en este estudio.

La DIVMS mostró una asociación negativa con los días de corte, a pesar de no encontrar diferencia estadística significativa, el sistema silvopastoril presentó una DIVMS de 77.74 % en comparación con 69.10 % del sistema monocultivo. Al respecto, Hernández *et al.* (2020), reporta resultados similares a los encontrados en este estudio, al mencionar que la DIVMS presenta una tendencia similar a la PC, porque el forraje se mantuvo más digestible en los primeros intervalos, disminuyendo de 4 a 8 puntos porcentuales a los 50 d, concluyendo que la PC y DIVMS en la gramínea disminuyó conforme aumentó el intervalo de descanso de la pastura en el sistema monocultivo y silvopastoril. En este sentido, Núñez *et al.* (2019), mencionan que el mayor crecimiento fuera de la copa de los árboles está relacionado con la menor calidad del pasto, debido a la rápida acumulación de lignina y celulosa en sus tejidos.

CONCLUSIONES

Las características de crecimiento y composición química observadas de *P. maximum* cv. Tanzania durante las diferentes etapas fenológicas en que fue evaluado, en particular en el sistema silvopastoril, puede deberse a la influencia de la sombra y al aporte de nitrógeno que le genera la asociación con *L. leucocephala* dentro del sistema. Este efecto, se manifiesta en una mejora de su contenido de nutrientes, particularmente, en la proteína cruda, la materia orgánica, así como en la concentración de carbohidratos estructurales.

La DIVMS mostró una asociación negativa con los días de corte, a pesar de no encontrar diferencia estadística significativa, el sistema silvopastoril presentó mayor DIVMS que el monocultivo.

El uso de la *L. leucocephala* en los sistemas ganaderos ofrece ventajas especiales si se considera que su follaje presenta un alto contenido de proteína (25 %) y que seguramente, se reflejará como una fuente importante de nitrógeno en la dieta de los rumiantes; además, de proveer de sombra natural al ganado en pastoreo y contribuir en alto grado a garantizar la conservación del suelo y al mejoramiento de su fertilidad.

REFERENCIAS

- Alvarado-Canché, A., Canul-Solis, J., Castillo-Sánchez, L. E., Campos-Navarrete, M. J., López-Cobá, E. H., Luna-Mendicuti, A. A., Ruz-Febles, N.M., Alayón-Gamboja J.A., Casanova-Lugo, F., Piñero-Vázquez, A.T. y Chay-Canul, A. 2022. Producción y calidad forrajera de *Cynodon plectostachyus* bajo sistema silvopastoril con *Leucaena leucocephala*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 25:1-9.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 17th edn. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical.
- Arana, S. M. 2009. Degradación de potreros en Comunidades Ganaderas de Áreas Naturales Protegidas de Chiapas. Tesis Profesional Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V, Chiapas, México.

- Canul-Solis, J.R., Castillo-Sánchez, L.E., Escobedo-Mex, J.G., López-Herrera, M.A. y Lara y Lara, P.E. 2018. Rendimiento y calidad forrajera de *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia* y *Cynodon nlemfuensis* en monocultivo y sistema agroforestal. *Agro ciencia* 52(6): 853-862.
- CATIE. 2002. Proyecto "Desarrollo participativo de alternativas de uso sostenible de la tierra para pasturas degradadas en centroamérica" Turrialba, Costa Rica, 28 p.
- Crespo, G. y Fraga, S. 2006. Avances en el conocimiento del reciclaje de los nutrientes en sistemas silvopastoriles. Memorias IV Congreso Latinoamericano de Agroforestería para la producción pecuaria sostenible. III Simposio sobre sistemas silvopastoriles para la producción ganadera sostenible. Varadero, Cuba. Pp 104.
- Cruz-Sánchez O. 2018. Producción de forraje y valor nutritivo del pasto mulato II (*Bracharia híbrido* 36087) a diferentes régimen de pastoreo. *Agroproductividad* 11: 18-23.
- Dillewijn, C.V. 1973. Botánica de la caña de azúcar. Edición Revolucionaria. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 460 p.
- Encinozo, G.O., Camacaro, C.S., Pinto, S.L. y Ríos D.A.L. 2017. Efecto de la presencia de sombra en áreas de pastoreo de ovinos. 1. Selección de especies forrajeras. *Pastos y Forrajes*. 40(1):65-72.
- Guenni, O., Seiter, S. y Figueroa R. 2008. Growth responses of three *Bracharia* species to light intensity and nitrogen supply. *Trop. Grassl.* 42:75-87
- Hernández, H.M., López O.S., Jarillo R.J., Ortega J.E., Pérez E.S., Díaz R.P. y Crosby G.M.M. 2020. Rendimiento y calidad nutritiva del forraje en un sistema silvopastoril intensivo con *Leucaena leucocephala* y *Megathyrus maximus* cv. Tanzania. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(1):53-69.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2003. Anuario Estadístico, Chiapas, México. 5 p.
- Lok, S. 2005. Estudio y selección de indicadores de la estabilidad en el sistema suelo-planta de pastizales en explotación. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 130 p.
- Medinilla-Salinas, L., Vargas-Mendoza, M., López-Ortiz, S., Ávila-Reséndiz, C., Campbell, W. y Gutiérrez-Castorena, M. 2013. Growth, productivity and quality of *Megathyrus maximus* under cover from *Gliricidia sepium*. *Agroforestry Systems*, 87:891-899.
- Nanami, S., Kawaguchi H., y Yamakura, T. 2011. Spatial pattern formation and relative importance of intra- and interspecific competition in codominant tree species, *Podocarpus nagi* and *Neolitsea aciculata*. *Ecol. Res.* 26:37-46.
- Núñez D.J., Ñaupari, V.J. y Flores, M.E. 2019. Comportamiento nutricional y perfil alimentario de la producción lechera en pastos cultivados (*Panicum maximum* Jacq.). *Rev. Inv. Vet. Perú* 30: 178-192.
- Obispo, N., Espinoza, Y., Gil, J., Ovalles, F. y Rodríguez M. 2008. Efecto del sombreado sobre la producción y calidad del pasto guinea (*Panicum maximum*) en un sistema silvopastoril. *Zootec. Trop.* 26: 285-288
- Paciullo, D.S.C., Gomide, C.A.M., Castro, C.R.T., Maurício, R.M., Fernández, P. B. y Morenz, M.J.F. 2016. Morphogenesis, biomass and nutritive value of *Panicum maximum* under different shade levels and fertilizer nitrogen rates. *Grass and Forage Science*. 72(3):590 -600.
- Padilla, C. 2002. Métodos de laboreo y fertilización química del suelo en la recuperación de un área forrajera de guinea *Panicum máximum* jacq.). *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*. 36(2):173-179.
- Páez, A., Gonzalez, M.E. y Villasmil, J. 1997. Acclimation of *Panicum maximum* to different light regimes. Effect of subsequent defoliation. *Rev. Fac. Agron. (Luz)*. 14: 625.
- Pérez, L.E., Kú V.J.C., Ramírez A.L. y Martínez H.S. 2012. Suplementación con *G. Sepium*: Su efecto en la digestión ruminal y el comportamiento de bovinos en pastoreo intensivo en la época de lluvias. **Pastos y Forrajes**. Suplemento1. 25(4):1-12
- Pezo, D. e Ibrahim, M. 1999. Sistemas silvopastoriles. Módulo de enseñanza agroforestal No 2. CATIE-GTZ. Turrialba, Costa Rica. 275 p.
- Pineda-Doporto, L.E., Castillo-Sánchez, A.R., Alvarado-Canché, M.J., Campos-Navarrete, A.J., Chay-Canul, A.T., Piñeiro-Vázquez, J.R. y Canul-Solis, J. R. 2019. Producción Forrajera de *Brachiaria brizantha* bajo Monocultivo y Sistema Silvopastoril. En: *Agroecosistemas tropicales: conservación de recursos naturales y seguridad alimentaria* Tecnológico Nacional de México. Pp. 422-426
- Rivas, L.R. 2002. Impacto económico de la adopción de pastos mejorados en América Latina tropical. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, CO. 38 p.
- Romero, D.G., Echevarría R.M., Trillo Z.F., Hidalgo L.V., Aguirre T.L., Robles R.R. y Núñez D.J. 2020. Efecto del faique (*Acacia macracantha*) sobre el valor nutricional del pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en un sistema silvopastoril. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 31(1): e17562.
- Sánchez, S., Crespo, G. y Hernández, M. 2007. Acumulación de hojarasca en un pastizal de *Panicum maximum* y en un sistema silvopastoril de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala*. *Pastos y forrajes* 30(3):139 p.
- Santiago-Hernández, F., López-Ortiz, S., Ávila-Reséndiz, C., Jarillo-Rodríguez, J., Pérez-Hernández P. y Guerrero-Rodríguez, D.J. 2016. Physiological and production responses of four grasses from the genera *Urochloa* and *Megathyrus* to shade from *Melia azedarach* L. *Agrofor. Syst.* 90:339-349.
- SAS. 2006. Institute Inc., SAS/STAT. Software, Ver. 9.00. SAS, Cary, NC, USA.
- Smethurst, P.J., Huth, N.I., Masikati, P., Sileshi, G.W., Akinnifesi, F.K., Wilson, J. y Sinclair, F. 2017. Accurate crop yield predictions from modelling tree crop interactions in gliricidia-maize agroforestry. *Agricultural Syst.* 155:70-77
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. y Dicky, D.A. 1997. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. 3rd Edition, McGraw Hill, Inc. Book Co., New York. 672 p.
- Szott, L., Ibrahim, M. y Beer, J. 2000. The hamburger connection hangover: cattle, pasture land degradation and alternative land use in central América, CATIE, Costa Rica. 43 p.
- Toledo, J. y Fisher, M. 1989. Aspectos fisiológicos de *Andropogon gayanus* y su compatibilidad con leguminosas forrajeras. En: *Andropogon gayanus* Kunth: Un pasto para los suelos ácidos del trópico. J. Toledo, R. Vera, C. Lascano y J. Lenné (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 69 p.
- Van Soest, P.J., Robertson J.B. y Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fibre neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Wong, C.C. y Wilson, J.R. 1980. Effects of shading on the growth and nitrogen content of green panic and siratro in pure and mixed swards defoliated at two frequencies. *Aust. Jour. Agric. Res.* 31: 269.
- Xavier, D.F., Ledo, F.J., Paciullo, D.S., Urquiaga, S., Alves, B.J. y Bodde, R.M. 2014. Nitrogen cycling in a *Brachiaria*-based silvopastoral system in the Atlantic Forest region of Minas Gerais, Brazil. *Nutr Cycl Agroecosys* 99: 45-62.



***Staphylococcus aureus* inactivation and maintenance of macronutrients of human milk by high hydrostatic pressure and spray-drying process**

Inactivación de *Staphylococcus aureus* y mantenimiento del valor nutricional de la leche humana por altas presiones hidrostáticas y secado por aspersion

Blanca Rosa Aguilar-Uscanga^a, Montserrat Calderon-Santoyo^b, Maricarmen Iñiguez-Moreno^{b,c}, Josue Raymundo Solis-Pacheco^a, Angel Fonseca-Cantabran^{a,b} and Juan Arturo Ragazzo-Sanchez^{b*}

^a Industrial Microbiology Laboratory. University Center of Exact Sciences and Engineering. University of Guadalajara. 1421, Boulevard General Marcelino Garcia Barragan, Col. Olimpica, C.P. 44430. Guadalajara, Jalisco, Mexico.

^b Integral Laboratory for Food Research, National Technological Institute of Mexico / Technological Institute of Tepic, Tepic, Nayarit, Mexico.

^c Polytechnic University of the State of Nayarit, Carretera Tepic-Aguamilpa, Tepic, Nayarit, Mexico.

RESUMEN

Los bancos de leche humana (BLH) utilizan la pasteurización y congelación, como principales métodos de conservación. Sin embargo, su valor nutricional disminuye durante la descongelación y almacenamiento. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de las altas presiones hidrostáticas (HHP) y el secado por aspersion sobre los macronutrientes, la calidad microbiológica e inactivación de *Staphylococcus aureus* en LH. Para ello, se realizó la cuantificación de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, bacterias lácticas, mesófilos aerobios, coliformes, mohos, levaduras y *S. aureus*. Los resultados mostraron que *S. aureus* y los grupos microbianos evaluados fueron reducidos por debajo del límite permitido por los BLH (<10 UFC/mL). Mientras que las concentraciones de macronutrientes permanecieron sin cambio durante todo el proceso de conservación. El uso de fibra soluble durante el proceso de secado permitió obtener un rendimiento mayor al 99 %. El polvo mostró alta solubilidad y bajos niveles de humedad y actividad en agua; las cuales son propiedades deseables en los alimentos deshidratados. Por lo tanto, la combinación de HHP y el proceso de secado por aspersion demostró ser una alternativa para facilitar el manejo y mejorar la calidad microbiológica de la leche humana.

Palabras clave: Leche humana, altas presiones hidrostáticas, secado por aspersion, *Staphylococcus aureus*, métodos de conservación

ABSTRACT

Human milk banks (HMB) use pasteurization and freezing methods to preserve the milk, nevertheless, the nutritional value of the human milk (HM) decreases during thawing and storage. This study aimed to evaluate the effect of high hydrostatic pressures (HHP) and spray-drying on macronutrients, microbiological quality, and inactivation of *Staphylococcus aureus* on HM. The characterization of HM powder, reduction of *S. aureus*, and modifications in microbiological viability, proteins, carbohydrates, lipids, and ashes were

assessed. The findings demonstrated that while *S. aureus* and all other examined microbial groups were undetectable, macronutrient concentrations remained constant during the entire conservation process. High yield (> 99 %) was achieved thanks to the inclusion of soluble fiber during the drying process, and the produced powder displayed high solubility, low moisture content, and activity water; which are desirable properties in dried foods. Therefore, the combination of HHP and the spray-drying process is an alternative to facilitate handling, improve the microbial quality, allow the addition of oligosaccharides, and maintain the nutritional value of HM in HMB.

Keywords: Human milk, high hydrostatic pressure, spray drying, *Staphylococcus aureus*, milk preservation

INTRODUCTION

Human milk (HM) is a biologically active food that contains high-biological value compounds and immunological constituents, that play a vital role in the modulation of the immune system in newborns and particularly in premature infants. For this, human milk banks (HMB) promote, protect, and support breastfeeding. Besides, these institutions are responsible for collection, conservation, and distribution of milk to feed premature infants and newborns with nutritional disorders (Lowry *et al.*, 1951; Slutzah *et al.*, 2010; Solís-Pacheco *et al.*, 2019). The high availability of nutrients in fresh HM provides an ideal culture media for several microbial groups, such as *Staphylococcus aureus*, one of the most important bacteria that can contaminate HM from origin, due to mastitis by infection (Koenig *et al.*, 2005; Mediano *et al.*, 2017). Besides, secondary contamination can occur due to unsatisfactory hygienic and sanitary handling conditions during extraction and storage (Mediano *et al.*, 2017). To control HM microbial populations, HMB implements several food conservation techniques, with refrigeration and pasteurization as the most widely studied methods (Koenig *et al.*, 2005; Novak and Cordeiro, 2007; Slutzah *et al.*, 2010; Wesolowska *et al.*, 2019). In line with this, HM can be stored at refrigeration temperature

*Author for correspondence: Juan Arturo Ragazzo Sanchez
e-mail: jragazzo@itteplic.edu.mx

Received: October 15, 2022

Accepted: January 03, 2023

(4 °C) for up to 96 h, without compromising its nutritional value and microbiological safety (Slutzhah *et al.*, 2010). Instead, pasteurization is the most common technique for food conservation. Microbial inactivation by this process is based on the maintenance of food temperature at 62.5 °C for 30 min and rapid cooling at 5 °C. Pasteurization inactivates vegetative bacteria and most viruses, including human immunodeficiency virus, herpes, and cytomegalovirus (Cavazos-Garduño *et al.*, 2016; Wesolowska *et al.*, 2019). After pasteurization, HM should be stored in airtight containers and frozen at -18 °C for preservation for four months. However, during this period, the nutrients of the milk are not guaranteed (Wesolowska *et al.*, 2019).

Some innovative technologies have been proposed to extend HM shelf-life preserving its nutritional value, including high-temperature short-time pasteurization, high hydrostatic pressure (HHP) processing, and microwave irradiation (Wesolowska *et al.*, 2019). However, once the HM microbial load has been inactivated, HM handling is still complicated due to the high volume required for storage. Recently, the spray-drying process demonstrated to be an alternative for reducing HM volume while maintaining more than 95 % of the macronutrients (Solís-Pacheco *et al.*, 2019). During this process, polysaccharides, proteins, and fiber can be added as wall materials, preventing volatilization and protecting encapsulated material against environmental conditions (Afoakwah *et al.*, 2012). In addition, the use of prebiotic fibers in the HM drying process could act as a source of oligosaccharides for newborns, who cannot obtain them directly from the mother's diet. The value of breastmilk oligosaccharides and dietary fibers, in complementary nutrition for the development of the infant's microbiome with both short- and long-term health complications, has been lately highlighted (Çavdar *et al.*, 2019). NUTRAFLORA® is a synthetic short-chain fructooligosaccharide, made by enzymatic reaction with sucrose. This prebiotic fiber is low in calories (1.5 kcal/g) and viscosity, and has stability at temperatures used during the High-Temperature Short-Time process (> 169 °C). Furthermore, is easy to dry and extrude, and does not participate in Maillard reactions. Its high solubility makes NUTRAFLORA® ideal for dry or liquid formulations (Ingredion, 2016). Hence, this study aimed to evaluate i) the effect of HHP pretreatment and the spray-drying process on the preservation of the macronutrients of HM added with prebiotic fiber, ii) the inhibition of microorganisms naturally present in HM, and iii) the reduction of *S. aureus* artificially inoculated in HM.

MATERIALS AND METHODS

Biological material and ethical considerations

Hospital Civil of Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" provide frozen samples from its HMB. The samples were transported in a cooler to the Laboratorio de Microbiología at Instituto Tecnológico de Tepic for analyses. The Ethical Research Committee approved this study on October 2019 No. HCG/CEI-1225/17.

Inoculation of *S. aureus* in HM

S. aureus ATCC 25923 was provided by the Laboratorio de Microbiología Industrial, Universidad de Guadalajara. The stock cultures were kept at -80 °C in tryptic soy broth (TSB; Becton Dickinson Bioxon, Le Pont de Claix, France) with 15 % (v/v) glycerol. Before experiments, 25 µL of stock cultures were transferred to 3 mL TSB and incubated at 35 °C for 18 h, then 25 µL were added to new TSB and incubated at 35 °C under static conditions for 18 h, to yield a final concentration of 10⁶ CFU/mL of microorganisms at stationary phase. Bacterial cells were harvested by centrifugation (9390 × *g* for 5 min), washed twice in sterile saline solution [SS, 0.85 % (w/v), sodium chloride at pH 7.0 ± 0.2], and centrifuged under the same conditions. Then, the bacterial cells were resuspended in the raw HM to a final concentration of 10⁶ CFU/mL (Bulut and Karatzas, 2021).

HM conservation process

For the HHP process, HM was thawed and homogenized. Then 250 mL of non- and inoculated-samples with *S. aureus* were vacuum-sealed in sterile FoodSaver® plastic bags (Newell Brands, Hoboken, NJ, USA) and pressurized at 300 MPa (Avure Autoclave Systems, Model LCIP402260NCEP1MLN, Eri, PA, USA) under different conditions (Table 1). HM was dried using a Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) with an inlet temperature of 165 °C and an air outlet temperature of 110 °C. The milk was fed with a 7 mm-diameter nozzle at a constant flow rate (2 mL/min); during the whole process, the sample was stirred at 100 rpm at 25 °C. Before drying, the spray dryer was stabilized with sterile distilled water (SDW) under the required operating conditions for 10 min. Soluble fiber (NUTRAFLORA® P-95 / L95-S, Ingredion, Ciudad de México, Mexico) was used as wall material at 5 % (w/v). The process yield was estimated (Eq. 1). Three replicates were used for the test and the experiment was repeated twice.

$$Yield (\%) = \frac{W_{SD}}{W_{SF}} 100 \quad (1)$$

Where: W_{DS} is the weight of dried milk and W_{SF} is the weight of solids in raw milk (Solís-Pacheco *et al.*, 2019). The powder was stored in PET/BOPP/PE zipper bags at 25 ± 2 °C.

Proximal analyses of HM and HM powder

Total protein was estimated by the method of Lowry *et al.* (1951), lipid content was determined by the gravimetric method described by Folch *et al.* (1957), and lactose concentration was obtained with Anthrone reagent following

Table 1. Conditions of high hydrostatic pressure treatments at 300 MPa.

Tabla 1. Condiciones utilizadas en los tratamientos de alta presión hidrostática a 300 MPa.

Treatment	Temperature (°C)	Time (min)
1	35	10
2	35	20
3	45	10
4	45	20

the method of Dubois *et al.* (1956). Protein and lactose quantification were carried out using calibration curves with casein at 595 nm and lactose at 490 nm; respectively. On the other hand, ashes were estimated by drying the samples in an oven at 240 °C for 24 h and the content was expressed as a percentage (Sögüt *et al.*, 2013). Each determination was carried out in triplicate and repeated once. The values were compared with the data obtained from the tests carried out using fresh HM. The methodological strategy realized in this study is represented in Figure 1.

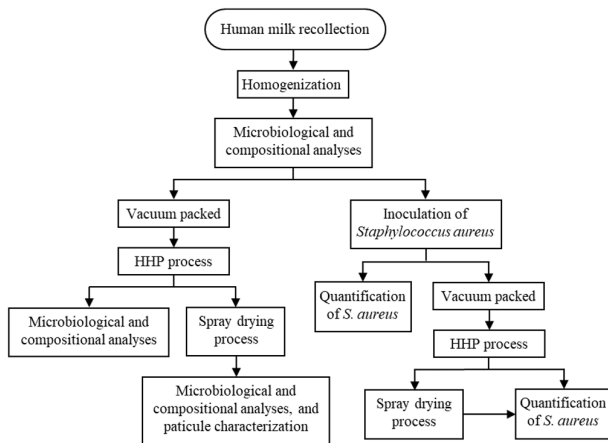


Figure 1. Methodological diagram of the effect of high hydrostatic pressure and spray drying on human milk compositional and microbiological loads.

Figura 1. Diagrama metodológico del efecto de la alta presión hidrostática y el secado por aerosolización sobre la composición y carga microbológica de la leche humana.

Microbiological analyses in HM and milk powder

Quantification of mesophilic aerobic bacteria, total coliforms, lactic acid bacteria, *S. aureus*, molds, and yeasts was carried out in raw milk according to Mexican standards (NOM-111-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, NOM-115-SSA1-1994, NOM-184-SSA1-2002). Microbial counts were carried out on Petri dishes with the corresponding culture media for each microbial group and incubated under different conditions. For yeast and molds, potato dextrose agar (PDA, Bioxon, Becton Dickinson and Company, Queretaro, Mexico) was used and the plates were incubated for 3 and 5 days at 25 °C. The culture media used for aerobic bacteria (tryptic soy agar, TSA; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), total coliforms (Red violet bile agar, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany), lactic acid bacteria (MRS agar, Oxoid, Basingstoke, UK), and *S. aureus* [Baird-Parker agar base (Difco, MI, USA) supplemented with egg yolk and 100 µg/mL potassium tellurite] were incubated at 37 °C for 24-48 h. Lactic acid bacteria were incubated under anaerobic conditions. Besides, after each conservation process yeast, molds, lactic acid bacteria, and coliforms were estimated as previously described in non-inoculated samples. Whereas, *S. aureus* was quantified in un- and treated inoculated samples. For dried milk, rehydration was carried out considering the moisture content of each sample. The

logarithmic microbial reduction was calculated (Eq. 2).

$$\text{Log}_{10} \left(\frac{N_0}{N} \right) = \text{Log}_{10} N_0 - \text{Log}_{10} N \quad (2)$$

where N_0 is the initial count and N is the survival count after treatment (Coroller *et al.*, 2006). Each test was carried out in triplicate and repeated once.

Moisture content (MC) of spray-dried milk

The MC was gravimetrically determined (da Silva Carvalho *et al.*, 2016). For this, 2 g of sample were used and the thermo-balance (Sartorius MA 35, Göttingen, Germany) was operated at 105 °C, the test was finished until weights remained constant. The test was carried out in triplicate and repeated twice.

Water activity (a_w)

The measurement was made by using 5 g of the sample in the hygroscopic Aqualab 4TEV (METER Group, Inc., Pullman, WA, USA). Calibration was carried out with a sodium chloride solution at 0.75 a_w . The test was carried out in triplicate and repeated twice.

Powder milk solubility

The test was carried out according to the protocol proposed by Cano-Chauca *et al.* (2005). Briefly, 1 g of the powder was added to 100 mL of distilled water and solubilized using a Vortex mixer (Genie 2, Daigger, Wheaton, IL, USA) at 3200 rpm for 5 min. The sample was centrifuged (Hermle Z326K, Wehingen, Germany) for 5 min at 3000 × g , then 25 mL of the supernatant were transferred to pre-weighed Petri dishes and immediately oven-dried at 105 °C for 5 h. The solubility percentage was calculated by weight difference. The test was carried out in triplicate and repeated twice.

Statistical analyses

Factorial designs were carried out. The data were subjected to analysis of variance, then; the post-hoc least significant difference (LSD) Fisher test ($p \leq 0.05$) was used for means comparison. Analyses were performed by using Statgraphics Centurion XVI.I software (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological quality of HM

HM is an ideal medium for the growth of microorganisms due to the high availability of nutrients. Some microorganisms, such as *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella* may contaminate HM due to inadequate procedures during its extraction and/or storage (Mediano *et al.*, 2017; Novak *et al.*, 2008). In this study, the HM from the Bank of Hospital Civil de Guadalajara showed low levels of aerobic mesophilic bacteria ($2.48 \pm 0.25 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$), *S. aureus* ($2.21 \pm 0.17 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$), and lactic acid bacteria ($1.31 \pm 0.44 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$). Whereas coliforms, molds, and yeast were not detected by the traditional counting plate. The initial counts of all tested microorganisms are below the established limits for pasteu-

rized milk or infant formula ('NOM-131-SSA1-2012, Products and services. Formulas for infants, continuation, and special nutritional needs. Food and non-alcoholic beverages for infants and young children. Provisions and specifications', 2012; 'NOM-184-SSA1-2002, Products, and Services. Milk, Milk Formula, and Milk Product Combined. Sanitary specifications', 2012; 'NOM-243-SSA1-2010, Milk, milk formula, combined milk product, and milk derivatives. Provisions and sanitary specifications. test methods', 2010) considering that the samples were still untreated. These results are in concordance with previous reports of fresh milk obtained from the same HMB (Cavazos-Garduño *et al.*, 2016; Solís-Pacheco *et al.*, 2019; Aguilar-Uscanga *et al.*, 2021). This fact allows us to infer the establishment and compliance of good practices for the obtention and handling of HM by the mentioned HMB. This is of vital importance to maintain microbiological quality and nutritional value, and to avoid infections in newborns via the presence of microorganisms in the milk (Hartmann *et al.*, 2007). However, the microbial load in HM can be higher than that obtained in this research due to some infections, such as mastitis. In HM samples from women with mastitis, the mean microbial load was 4.11 Log₁₀ CFU/mL. The staphylococcal group is the most frequently isolated (97.57 %), with *Staphylococcus epidermidis* (91.56 %) and *S. aureus* (29.74 %) as the most common species isolated from mastitis samples (Mediano *et al.*, 2017). Inadequate sanitation and handling during milk extraction result in its contamination with *E. coli* and *Salmonella*, while *S. aureus* contamination of HM occurs in breastfeeding women as a result of clinical mastitis (Kaavya *et al.*, 2021; Mediano *et al.*, 2017). In addition, *S. aureus* is present in the oropharynx and skin of humans, and its presence in HM may be due to secondary contamination or to unsatisfactory hygienic and sanitary conditions of the extraction apparatus used (Mediano *et al.*, 2017).

Proximal analysis of HM

The initial estimated values of lactose, lipids, proteins, and ashes in raw HM were 7.36 ± 0.94, 2.46 ± 0.26, 1.65 ± 0.59 g/dL, and 0.26 ± 0.02 %; respectively. These results are in concordance with previous reports for Mexican fresh HM (Cavazos-Garduño *et al.*, 2016; Solís-Pacheco *et al.*, 2019) and with the generally assumed HM composition (Boquien, 2018). After the HHP processing, the assessed components

were maintained at more than 95 % (Table 2). This behavior agrees with the results of Solís-Pacheco *et al.* (2019) for spray-dried HM under the same conditions. However, after the spray-drying process lactose showed a significant reduction in comparison to raw milk ($p \leq 0.05$), but without change in comparison to unpressurized dry HM ($p > 0.05$). During the spray-drying process, chemical and physical changes such as crystallization and nonenzymatic browning as the Maillard reactions can occur, reducing the lactose concentration (Kinsella and Morr, 1984; Uscanga *et al.*, 2021). Besides, the concentration of macronutrients in HM can be influenced by various processes, such as storage, freezing, and thawing. It has been reported that freezing, thawing, and spray-drying processes can decrease the lipid content in HM by up to 9.0 %, attributable to its adherence to the wall of container and equipment, incomplete homogenization, lipolysis, or lipid peroxidation (Cavazos-Garduño *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2012). In this research, the variation in lipid content after HHP and spray-drying were not significant ($p \leq 0.05$; Table 3). The increment in ashes content in the HM powder was attributed to the use of soluble fiber as wall material, which can contain between 1.60 and 2.30 % of ashes depending on the source and variety (Ragae *et al.*, 2012).

Microbial reduction and inactivation of *S. aureus* by conservation process

Microbial inactivation by HHP depends on several factors including treatment conditions (surrounding media, temperature, pressure, time, etc.) and microbial characteristics (vegetive or spore cells, composition of the cell wall, physiological state, and so on) (Kaavya *et al.*, 2021; Salleh-Mack and Roberts, 2007). The lethal effect of treatments on bacterial cells increased as a temperature function ($p \leq 0.05$; Table 4). This is in agreement with a previous report on the inactivation of *S. aureus* and *Bacillus cereus* spores in HM after 4 cycles of 5 min at 38 °C and 350 MPa (Demazeau *et al.*, 2018). In line with this, it has been demonstrated that *S. aureus* inactivation in cow's whole milk at 20 °C occurs at >250 MPa and 8 min under these conditions, a decimal reduction after 3.7 min at 300 MPa was reported (Erkmen and Karataş, 1997). The composition of the cell wall and shape of the bacteria are related to their resistance. Spherical organisms ought to be more resistant to crushing than those rod-shaped

Table 2. Effect of high hydrostatic pressure on the composition of human milk.
Tabla 2. Efecto de alta presión hidrostática en la composición de la leche humana.

Treatment	Lactose (g/dL)	Lipids (g/dL)	Proteins (g/dL)	Ashes (%)	Humidity (%)
1	6.71 ± 0.69 ^a	2.89 ± 0.17 ^a	1.49 ± 0.10 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	86.19 ± 0.50 ^a
2	7.42 ± 0.06 ^a	2.44 ± 0.84 ^a	1.37 ± 0.64 ^a	0.20 ± 0.05 ^a	86.13 ± 0.07 ^a
3	6.98 ± 0.63 ^a	1.90 ± 0.70 ^a	1.44 ± 0.22 ^a	0.31 ± 0.06 ^a	86.81 ± 0.68 ^a
4	6.85 ± 0.60 ^a	2.34 ± 0.14 ^a	1.39 ± 0.43 ^a	0.30 ± 0.09 ^a	86.37 ± 0.34 ^a

Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 6). Parameters of raw human milk: lactose 7.36 ± 0.94 g/dL; lipids 2.46 ± 0.46 g/dL; proteins 1.65 ± 0.59 g/dL; and ashes 0.26 ± 0.02 %. Values in the same column followed by different letters are significantly different according to Fisher's LSD test at $p \leq 0.05$.

Table 3. Effect of spray-drying on the composition of human milk.
Tabla 3. Efecto del secado por aspersión en la composición de la leche humana.

Treatment	Lactose (g/dL)	Lipids (g/dL)	Proteins (g/dL)	Ashes (%)
Control	6.25 ± 0.75 ^{ab}	2.32 ± 0.52 ^a	2.01 ± 0.63 ^a	1.50 ± 0.29 ^{a*}
1	6.99 ± 0.18 ^a	2.23 ± 0.11 ^a	1.83 ± 1.00 ^a	1.32 ± 0.07 ^{a*}
2	5.88 ± 0.39 ^{b*}	2.18 ± 0.41 ^a	1.32 ± 0.82 ^a	1.49 ± 0.11 ^{a*}
3	6.83 ± 0.39 ^a	2.06 ± 0.24 ^a	1.73 ± 0.37 ^a	1.57 ± 0.32 ^{a*}
4	5.74 ± 0.13 ^{b*}	1.95 ± 0.17 ^a	1.30 ± 0.30 ^a	1.34 ± 0.05 ^{a*}

Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 6). Parameters of raw human milk: lactose 7.36 ± 0.94 g/dL; lipids 2.46 ± 0.46 g/dL; proteins 1.65 ± 0.59 g/dL; and ashes 0.26 ± 0.02 %. Control: raw or unpressurized dried milk. *: Indicates a significant difference in comparison with the initial value in raw milk. Values in the same column followed by different letters are significantly different according to Fisher's LSD test at $p \leq 0.05$.

Table 4. Reduction of *Staphylococcus aureus* after the conservation process.
Tabla 4. Reducción de *Staphylococcus aureus* después de los tratamientos de conservación.

Treatment	HHP	HHP + Spray drying
1	2.45 ± 0.53 ^a	ND
2	2.40 ± 0.55 ^a	ND
3	ND	ND
4	ND	ND

HHP: High hydrostatic pressure. Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 6). Initial load 6.98 ± 0.23 CFU/mL. Values in the same column followed by different letters are significantly different according to Fisher's LSD test at $p \leq 0.05$. ND: the microorganism was not detected after the treatment.

ones, being consistent with the idea that the lethal action of pressure changes that accompany their passage through liquids (Jacobs and Thornley, 1954). The HHP disrupts the bacterial membrane, being Gram-positive more resistant than Gram-negative bacteria (Costello *et al.*, 2021; Huu *et al.*, 2021; Repine *et al.*, 1981). This is related to the different peptidoglycan content, which is higher in Gram-positive (30-70 %) than in Gram-negative (< 10 %) bacteria, making them more resistant to pressure (Schumann, 2011). Microorganisms can resist high pressures, due to membrane fluidity. However, the synergistic effect of the temperature contributes to the destabilization of the outer and inner membrane, releasing intracellular components (Huu *et al.*, 2021; Kaavya *et al.*, 2021; Salleh-Mack and Roberts, 2007).

Spray drying is a technique widely used for milk powder production. This process is not aimed to cause microbial inactivation

(Alvarenga *et al.*, 2018). However, it showed a synergistic effect in pressurized HM samples contributing to the complete inactivation of *S. aureus* during the drying process, because cells suffered previous damage by the HHP (Bulut and Karatzas, 2021) (Table 4). Temperature can have a cumulative or synergistic effect (depending on the environmental conditions, particularly the media) on the HHP treatments, favoring microbial reduction (Zenker *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2020). According to Calvoa *et al.* (2018), human milk should be discarded after a pasteurization process, when it has a total microbiological content equal to or greater than 10 CFU/mL, in our case a higher number of bacteria was not found in the human milk samples, after high-pressure processes and spray drying.

Properties of HM powder

The MC of the powders ranged from 2.08 to 2.88 % (Table 5), whereas the microparticles a_w showed values between 0.15 and 0.33. These results agree with the previous report of spray-dried HM without wall materials for which the MC and a_w estimated were 1.7 ± 0.74 % and 0.21 ± 0.15, respectively (Solís-Pacheco *et al.*, 2019). MC and a_w values lower than 5 % and 0.6, respectively, are optimal to reduce microbiological spoilage and prevent lipid oxidation (Sun *et al.*, 2020).

On the other hand, the HM powder solubility was up to 99 %, demonstrating that the macronutrients in HM did not developed insoluble complexes with the fiber, without affecting their availability. This parameter rarely has been assessed for HM, however, is widely studied in dried milk from

Table 5. Properties of dried human milk.
Tabla 5. Propiedades de la leche humana en polvo.

Treatment	Moisture content (%)	Water activity	Solubility (%)	Yield (%)
Control	2.71 ± 0.79 ^a	0.33 ± 0.14 ^a	99.1 ± 0.04 ^a	97.02 ± 0.13 ^a
1	2.39 ± 0.35 ^a	0.21 ± 0.04 ^a	99.0 ± 0.02 ^a	91.73 ± 1.74 ^b
2	2.88 ± 0.49 ^a	0.20 ± 0.10 ^a	99.0 ± 0.05 ^a	97.02 ± 0.09 ^a
3	2.08 ± 0.38 ^a	0.15 ± 0.05 ^a	99.4 ± 0.02 ^a	88.66 ± 1.98 ^b
4	2.69 ± 0.89 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	99.2 ± 0.03 ^a	92.24 ± 2.21 ^b

Control: raw or unpressurized dried milk. Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 6). Values in the same column followed by different letters are significantly different according to Fisher's LSD test at $p \leq 0.05$.

other species. For dromedary and cow's milk, the estimated solubility ranged from 91-95 % and 78-88 %; respectively, at an inlet temperature of 230 °C during the drying process (Felfoul *et al.*, 2022). Otherwise, for dried camel milk the solubility was in function of the inlet temperature, being higher at 140 °C than at 200 °C (Habtegebriel *et al.*, 2018). Therefore, the difference between this study and other reports is related to the specie, and the drying processing parameters, due to the milk powder obtained at a less severe processing temperature, the powder retains higher solubility of milk proteins (Habtegebriel *et al.*, 2018).

The yield of the spray-drying process for HM added with soluble fiber was up to 99 %. This result is higher than the obtained for groundnut (82.72 %, inlet temperature 186 °C) (Saha *et al.*, 2019), dromedary and cow milk (94.99 %, inlet temperature 230 °C, and 95.54 %, inlet temperature 230 °C, respectively) (Felfoul *et al.*, 2022). The yield of the spray-drying process is strongly dependent on inlet temperature. Generally is assumed that the use of high inlet temperatures (180-230 °C) provides a higher yield (Felfoul *et al.*, 2022; Saha *et al.*, 2019). However, this is not the only important variable in the yield of dried milk. For camel milk, the total solids recovery in the cyclone increased by an increment of the inlet temperature and airflow rate, whereas decreased with an increase in the total solids content of milk (Habtegebriel *et al.*, 2018). An increment in the total solids of the milk is related to a viscosity increment, difficulty feeding, and aspersion rate resulting in droplets sticking with the drying chamber (Habtegebriel *et al.*, 2018; Langrish *et al.*, 2006). Otherwise, the high yield obtained in this research could be related to the use of soluble fiber, which, additionally, can contribute to macronutrient maintenance. In milk, the concentration of macronutrients in HM can be influenced by various processes, such as storage, freezing, thawing, and spray-drying processes. These techniques can decrease the lipid content in HM by up to 9.0 %, attributable to its adherence to the wall of the dryer chamber and equipment, faults homogenization, lipolysis, or lipid peroxidation (Cavazos-Garduño *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2012). Otherwise, aggregation of casein micelles produces variation in the protein concentration (Chang *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

The combination of HHP and spray-drying technique is an alternative process that allows the maintenance of the value of lactose, lipids, proteins, and ashes in HM. These values were not affected by the use of each treatment alone or in combination. HHP (300 MPa) by itself reduced the microbial loads to undetectable levels, even for *S. aureus* artificially inoculated, if the process was carried out at 45 °C. However, the use of spray-drying after the HHP at 35 °C reduced the remanent microorganisms. Hence, to assure the HM safety the treatment recommendable would be HHP at 45 °C for 10 min followed by the spray-drying process. The transformation of an HM into a powder facilitates its storage and handling in an HMB. The low a_w and MC values are of great importance as

are related to food spoilage reduction in dried foods. Besides, the use of soluble fiber as wall material allowed us to obtain a high yield from the spray-drying process.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde" of Guadalajara and Universidad de Guadalajara for providing the means to carry out this work.

REFERENCES

- Aguilar-Uscanga, B.R., Pacheco, J.R.S., Ragazzo-Sánchez, J.A., Garduño, A.C., Valdéz, J.C.M., Arreola, A. R. and Niño, J.C.S. 2021. Assessment of the accelerated shelf life of human milk dehydrated by aspersion and treated by UV, high pressures, and pasteurization. *Journal of Food Quality*. 2021.
- Afoakwah, A., Adomako, C., Owusu, J., Engman, N., and Hannah, A.A. 2012. Spray drying as an appropriate technology for the food and pharmaceutical industries-a review. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering and Technology*. 1: 467-476.
- Alvarenga, V.O., Campgnollo, F.B., Pia, A.K.R., Conceição, D.A., Abud, Y., Sant'Anna, C., Hubinger, M.D. and Sant'Ana, A.S. 2018. Quantifying the responses of three *Bacillus cereus* strains in isothermal conditions and during spray drying of different carrier agents. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1113.
- Boquien, C.Y. 2018. Human milk: An ideal food for nutrition of preterm newborn. *Frontiers in Pediatrics*. 6: 295.
- Bulut, S. and Karatzas, K.A.G. 2021. Inactivation of *Escherichia coli* K12 in phosphate buffer saline and orange juice by high hydrostatic pressure processing combined with freezing. *LWT - Food Science and Technology*. 136: 110313.
- Calvoa, J., García Lara, N.R., Gormaz, M., Peña, M., Martínez, M.J., Ortiz, P., Brull, J.M. Samaniego, C.M. and Gayà, A. 2018. Recomendaciones para la creación y el funcionamiento de los bancos de leche materna en España. 89(1): Asociación Española de Pediatría. 65.e1-65.e6.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M. and Cal-Vidal, J. 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 420-428.
- Cavazos-Garduño, A., Serrano-Niño, J.C., Solís-Pacheco, J.R., Gutierrez-Padilla, J.A., González-Reynoso, O., García, H.S. and Aguilar-Uscanga, B.R. 2016. Effect of pasteurization, freeze-drying and spray drying on the fat globule and lipid profile of human milk. *Journal of Food and Nutrition Research*. 4: 296-302.
- Çavdar, G., Papich, T. and Ryan, E.P. 2019. Microbiome, breastfeeding and public health policy in the United States: The case for dietary fiber. *Nutrition and Metabolic Insights*. 12: 117863881986959.
- Chang, Y.C., Chen, C.H. and Lin, M.C. 2012. The macronutrients in human milk change after storage in various containers. *Pediatrics and Neonatology*. 53: 205-209.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N. and Mafart, P. 2006. General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6493-6502.

- Costello, K.M., Velliou, E., Gutierrez-Merino, J., Smet, C., Kadri, H. El, Impe, J.F.V. and Bussemaker, M. 2021. The effect of ultrasound treatment in combination with nisin on the inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 79: 105776.
- da Silva Carvalho, A.G., da Costa Machado, M.T., da Silva, V.M., Sartoratto, A., Rodrigues, R.A.F. and Hubinger, M.D. 2016. Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract. *Powder Technology*. 294: 421-428.
- Demazeau, G., Plumecocq, A., Lehours, P., Martin, P., Couëdelo, L. and Billeaud, C. 2018. A new high hydrostatic pressure process to assure the microbial safety of human milk while preserving the biological activity of its main components. *Frontiers in Public Health*. 6: 306.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Erkmen, O. and Karataş, Ş. 1997. Effect of high hydrostatic pressure on *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Engineering*. 33: 257-262.
- Felfoul, I., Burgain, J., Perroud, C., Gaiani, C., Scher, J., Attia, H. and Petit, J. 2022. Impact of spray-drying conditions on physicochemical properties and rehydration ability of skim dromedary and cow's milk powders. *Drying Technology*. 40: 665-677.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.
- Habtegebriel, H., Edward, D., Wawire, M., Sila, D. and Seifu, E. 2018. Effect of operating parameters on the surface and physico-chemical properties of spray-dried camel milk powders. *Food and Bioproducts Processing*. 112: 137-149.
- Hartmann, B.T., Pang, W.W., Keil, A.D., Hartmann, P.E. and Simmer, K. 2007. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Human Development*. 83: 667-673.
- Huu, C.N., Rai, R., Yang, X., Tikekar, R.V. and Nitin, N. 2021. Synergistic inactivation of bacteria based on a combination of low frequency, low-intensity ultrasound and a food grade antioxidant. *Ultrasonics Sonochemistry*. 74: 105567.
- Ingredient. (2016). NUTRAFLORA® P-95 / L95-S Fibra Soluble Prebiótica. [Accessed Dec 08 2022] 2021. Available in: <https://www.ingredient.com/content/dam/ingredient/pdf-downloads/cono-sur/NUTRAFLORA.pdf>
- Jacobs, S.E. and Thornley, M.J. 1954. The lethal action of ultrasonic waves on bacteria suspended in milk and other liquids. *Journal of Applied Bacteriology*. 17: 38-56.
- Kaavya, R., Pandiselvam, R., Abdullah, S., Sruthi, N.U., Jayanath, Y., Ashokkumar, C., Chandra K.A., Kothakota, A. and Ramesh, S.V. 2021. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food. *Trends in Food Science and Technology*. 112: 400-418.
- Kennedy, J., Blair, I.S., McDowell, D.A. and Bolton, D.J. 2005. An investigation of the thermal inactivation of *Staphylococcus aureus* and the potential for increased thermotolerance as a result of chilled storage. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 1229-1235.
- Kinsella, J.E. and Morr, C.V. 1984. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 21: 197-262.
- Koenig, Á., de Albuquerque, E. M., Correia, S. F. and Costa, F. A. 2005. Immunologic factors in human milk: The effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation*. 21: 439-443.
- Langrish, T.A.G., Marquez, N. and Kota, K. 2006. An investigation and quantitative assessment of particle shape in milk powders from a laboratory-scale spray dryer. *Drying Technology*. 24: 1619-1630.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Mediano, P., Fernández, L., Jiménez, E., Arroyo, R., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J.M. and Marín, M. 2017. Microbial diversity in milk of women with mastitis: Potential role of Coagulase-Negative Staphylococci, Viridans Group Streptococci, and Corynebacteria. *Journal of Human Lactation*. 33: 309-318.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. [Accessed May 15 2015] 1994. Available in: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. [Accessed May 15 2015] 1994. Available in: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69536.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos 1994. [Accessed May 16 2015] 1994. Available in: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69539.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones 2012. [Accessed May 02 2015] 1994. Available in: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5267447&fecha=10/09/2012#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. [Accessed May 04 2015] 2002. Available in: https://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=690308#:~:text=NOM%2D184%2DSSA1%2D2002,23%20de%20octubre%20de%202002.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. [Accessed April 18 2015] 2010. Available in: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>
- Novak, F.R. and Cordeiro, D.M.B. 2007. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. *Jornal de Pediatria*. 83: 87-91.
- Novak, F.R., Junqueira, A.R., Dias, M.D.S.P. C. and Almeida, J.A.G. 2008. Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. *Jornal de Pediatria*. 84: 181-184.
- Ragaei, S., Guzar, I., Abdel-Aal, E.S.M. and Seetharaman, K. 2012. Bioactive components and antioxidant capacity of Ontario hard and soft wheat varieties. *Canadian Journal of Plant Science*. 92: 19-30.

- Repine, J.E., Fox, R.B. and Berger, E.M. 1981. Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 7094-7096.
- Saha, D., Nanda, S.K. and Yadav, D.N. 2019. Optimization of spray drying process parameters for production of groundnut milk powder. *Powder Technology*. 355: 417-424.
- Salleh-Mack, S. Z. and Roberts, J. S. 2007. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14: 323-329.
- Schumann, P. 2011. Peptidoglycan structure. In *Methods in Microbiology*. 38, pp. 101-129. Cambridge: Academic Press, United Kingdom.
- Slutzah, M., Codipilly, C.N., Potak, D., Clark, R.M. and Schanler, R.J. 2010. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *Journal of Pediatrics*. 156: 26-28.
- Sögüt, Ö., Bali, T., Baltas, H. and Apaydin, G. 2013. Determination of trace elements in ashes of milk samples by using XRF technique. *Asian Journal of Chemistry*. 25: 4385-4388.
- Solís-Pacheco, J.R., Rodríguez-Arreola, A., Gutiérrez-Padilla, J.A., García Morales, E., Castro-Albarrán, J., Balcázar-López, E., Cavazos-Garduño, A. and Uscanga-Aguilar, B.R. 2019. Human milk powder an alternative for better conservation and healthier use in the banks of human milk. *CPQ Nutrition*. 3: 1-12.
- Sun, X., Cameron, R.G. and Bai, J. 2020. Effect of spray-drying temperature on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of pectin/sodium alginate microencapsulated carvacrol. *Food Hydrocolloids*. 100: 105420.
- Wesolowska, A., Sinkiewicz-Darol, E., Barbarska, O., Bernatowicz-Lojko, U., Borszewska-Kornacka, M.K. and van Goudoever, J.B. 2019. Innovative techniques of processing human milk to preserve key components. *Nutrients*. 11: 1169.
- Zenker, M., Heinz, V. and Knorr, D. 2003. Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. *Journal of food protection*. 66: 1642-1649.
- Zhang, H., Tikekar, R.V., Ding, Q., Gilbert, A.R. and Wimsatt, S. T. 2020. Inactivation of foodborne pathogens by the synergistic combinations of food processing technologies and food-grade compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19: 2110-2138.



Inducción de cambios de tamaño, color y en cutícula en bayas de uva de mesa por medio de biorreguladores

Bioregulators induction changes in size, color and cuticle of table grapes berries

González-García L.C.¹, Sánchez-Estrada A.^{1*}, Mercado-Ruiz J.N.¹, Báez-Sañudo R.², González-León A.¹

¹ Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Gustavo Enrique Astiazarán Rosas 46, Hermosillo, Sonora, México. 83304. Tel.: +52-(662) 2892400.

² Sistemas de gestión de la inocuidad y calidad. Manejo Postcosecha de Frutas y Hortalizas.

RESUMEN

La irregularidad del color y el bajo calibre de las bayas en la uva de mesa en el desierto Sonorense representan un reto para su exportación. Se evaluó el efecto de la aplicación de biorreguladores en el envero sobre el tamaño, peso, color y cambios cuticulares en la baya de uva de mesa cv. "Flame Seedless". Se diseñaron ocho tratamientos: TEST (Testigo), ETH1 (Ethrel 100 mg L⁻¹), ETH2 (Ethrel 250 mg L⁻¹), AS (ácido salicílico 100 mg L⁻¹), MEL (melatonina 25 mg L⁻¹) y la combinación de ETH2+AS, ETH2+MEL y AS+MEL. El mayor peso se obtuvo en bayas tratadas con MEL, ETH2+MEL y AS+MEL (4.75, 5.46 y 5.14 g respectivamente), mientras el testigo alcanzó 3.75 g; se observó un comportamiento similar en tamaño, alcanzando un calibre extra en los tratamientos MEL y combinaciones. El índice de color (CIRG) más alto se obtuvo en las bayas tratadas con ETH con valores superiores a 2.0, mientras que los otros tratamientos fueron menores a este valor, ningún tratamiento alcanzó el CIRG óptimo (4-5). No se observaron diferencias ($p \leq 0.05$) en el contenido de ceras intracuticulares, permeabilidad y grosor de la cutícula, en cambio en el contenido de ceras epicuticulares el testigo (0.64 mg cm⁻²) fue significativamente superior a los tratamientos, mientras que en el peso de la cutícula fue significativamente inferior con respecto a los tratamientos con reguladores. Los tratamientos aplicados no estimularon suficientemente la biosíntesis de antocianinas para producir un incremento significativo de color en las uvas tratadas, aunque se observó una mejora en el calibre de las bayas sin afectar las propiedades de la cutícula.

Palabras clave: Flame Seedless, CIRG, antocianinas, ceras cuticulares, cutícula.

ABSTRACT

The irregularity of the color and the small size of berries in the Sonoran Desert table grapes represent a challenge for their export. The effects of the application of bioregulators at veraison were evaluated on the size, weight, color and cuticle changes in the berry of table grape cv. "Flame Seedless". Eight treatments were evaluated: TEST (Control), ETH1 (Ethrel 100 mg L⁻¹), ETH2 (Ethrel 250 mg L⁻¹), AS (salicylic acid 100 mg L⁻¹), MEL (melatonin 25 mg L⁻¹) and the combination of ETH2+AS, ETH2+MEL and AS+MEL. A higher weight was obtained in

berries treated with MEL, ETH2+MEL and AS+MEL (4.75, 5.46 and 5.14 g respectively), while the control weighed only 3.75 g; similar behavior was presented in the size of the berries in which they reached a superior caliber with the MEL and combinations treatments. The highest color index (CIRG) was obtained in ETH treated berries with values greater than 2.0, while the other treatments were lower, but no treatment reached the optimal CIRG (4-5). No differences ($p \leq 0.05$) were observed in the content of intracuticular waxes, permeability and thickness of the cuticle; on the other hand, in the content of epicuticular waxes, the control (0.64 mg cm⁻²) was significantly higher than treatments and significantly lower in cuticle weight. The applied treatments did not sufficiently stimulate anthocyanin biosynthesis to produce a significant increase in color in treated grapes, although an improvement in berries size was observed without affecting cuticle properties.

Key words: Flame Seedless, CIRG, anthocyanins, cuticular waxes, cuticle.

INTRODUCCIÓN

El color y el calibre del fruto son características importantes de la baya en cuanto a calidad se refiere para la comercialización y exportación de la uva de mesa (*Vitis vinifera* L.). En el desierto de Sonora, las variedades de uvas rojas como "Flame Seedless" presentan alteraciones en el color y un porcentaje alto de bayas que no cumplen con los calibres requeridos. Estas alteraciones se deben principalmente al efecto de la luminosidad y la temperatura sobre las bayas (Boss y Davies, 2009; Movahed *et al.*, 2016).

Para mejorar el color y en algunos casos el tamaño de las bayas, se han implementado prácticas como el anillado (Crupi *et al.*, 2016), aclareo (Kaur *et al.*, 2013) y sombreado de racimos (Leguizamón *et al.*, 2008) pero con resultados inciertos. Una alternativa ha sido el uso de reguladores del crecimiento como el ácido giberélico destinados a aumentar el tamaño de la baya resultando en la inhibición del color (Ferrara *et al.*, 2013); en cambio liberadores de etileno como el etefon (Hueso, 2012) o ácido abscísico (Deluc *et al.*, 2009; Alenazi *et al.*, 2019) mejoraron el color de la cáscara, debido a que estos compuestos regulan parcialmente la síntesis y acumulación de antocianinas, sin afectar el contenido de

*Autor para correspondencia: Alberto Sánchez Estrada
 Correo electrónico: aestrada@ciad.mx

Recibido: 19 de octubre de 2022

Aceptado: 22 de febrero de 2023

azúcar y acidez. A pesar de su eficacia, se han observado afectaciones en firmeza de la baya reduciendo su calidad y vida de anaquel (Peppi *et al.*, 2006); además con el inconveniente del costo y la residualidad que puede superar los niveles máximos permitidos (Báez-Sañudo *et al.*, 2021).

Otros biorreguladores, como el ácido salicílico actúan incrementando la concentración de ácidos fenólicos (Habibi, 2017), mejora el color en cereza (Giménez *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2020) y uva cv. Sahebi (Oraei *et al.*, 2019), debido a la activación de la enzima fenilalanina amoniliasa (PAL), involucrada en la biosíntesis de antocianinas. Por otro lado, una indolamina como melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) induce la biosíntesis de flavonoides y antocianinas en diversas especies vegetales (Sun *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Aghdam y Fard, 2017; Arnao y Hernández, 2019).

Otra asignatura pendiente en la uva es el efecto de los reguladores aplicados exógenamente para estimular el color sobre la cutícula. Dado que estos se encargan de controlar diversos procesos fisiológicos como el crecimiento de las bayas (Janda *et al.*, 2014), es precisamente en el envero el momento crítico para estimular el desarrollo de color y engorde del fruto ya que las clorofilas se degradan, seguido de la biosíntesis de antocianinas (Seymour *et al.*, 2013) y la expansión celular junto a los cambios cuticulares de las bayas (Carbonell-Bejerano y Martínez-Zapater, 2013).

La cutícula es una barrera permeable que posee ceras encargadas de reducir la permeabilidad de la cutícula del fruto (Tafolla *et al.*, 2013), estas ceras regulan el intercambio de gases e intervienen en la integridad del fruto y vida post-cosecha (Trivedi *et al.*, 2019). Las ceras epicuticulares en las bayas aumentan durante las primeras fases de crecimiento y decrecen al madurar, la cutícula se adelgaza a medida que el tamaño de la baya aumenta, provocando micro y macropartiduras que hacen susceptible al fruto a factores bióticos y abióticos (Pensec *et al.*, 2014).

Los estudios con biorreguladores se han enfocado principalmente en mejorar el color, pero escasamente a los cambios en la cutícula de las bayas, por lo que se propone evaluar el efecto de la aplicación precosecha de tratamientos con Ethrel, ácido salicílico y melatonina, sobre los cambios en tamaño, color y de cutícula en las bayas de uva de mesa "Flame Seedless".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental y tratamientos

Para este estudio se utilizaron plantas de uva de mesa (*V. vinifera* L.) "Flame Seedless" de 8 años de edad, provenientes de un viñedo ubicado en Sonora, México (29°21'51"LN y 110°57'08"LO). Los tratamientos fueron aplicados por aspersión directa a los racimos de 5 plantas/tratamiento a los 60 días después de plena floración (ddpf) durante la etapa de envero. Los tratamientos fueron: Testigo (TEST), ETH1 (Ethrel^{MR} 240, Bayer, Alemania), ETH2, ácido salicílico (Fagalah, México), melatonina (Sigma, USA), mezcla de ETH2+AS, ETH2+Mel, y AS+Mel (Tabla 1) a todas las mezclas se le añadió 2 mL L⁻¹ de surfactante (Tween 80, Fagalah, México).

Tabla 1. Tratamientos.

Table 1. Treatments.

Tratamiento	Composición	No. Aplicaciones
TEST	Testigo	0
ETH1	Ethrel a 100 µL L ⁻¹	3
ETH2	Ethrel a 250 µL L ⁻¹	1
AS	Ácido Salicílico a 100 µL L ⁻¹	1
MEL	Melatonina a 25 µL L ⁻¹	1
ETH2+AS	1:1 mezcla de tratamiento ETH2+AS	1
ETH2+MEL	1:1 mezcla de tratamiento ETH2+MEL	1
AS+MEL	1:1 mezcla de tratamiento AS+MEL	1

Muestreo y análisis estadístico

A los 74 ddpf se cosecharon 15 racimos/tratamiento en madurez de consumo. El experimento se analizó con un diseño completamente al azar considerando ocho tratamientos, el número de repeticiones utilizados dependió de cada variable analizada dada la naturaleza de la técnica y la representatividad poblacional (las bayas se tomaron de tres estratos del racimo: basal, medio y apical). Para variables de diámetro y peso fueron 5 repeticiones con 20 bayas; para la variable de color se utilizaron 16 bayas con dos mediciones por baya. El número de repeticiones de las variables: antocianinas, contenido de ceras epi e intracuticulares, así como peso, permeabilidad y grosor de la cutícula se especifican en la metodología empleada descritas más adelante. La prueba de comparación de medias se realizó por el método Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS Versión 9.3 (2012).

Determinación de diámetro y peso de bayas

En 100 bayas tomadas al azar de los 15 racimos cosechados por tratamiento se pesaron individualmente en una balanza digital en g (DENVER Instruments, XP-3000, Colorado, EUA), se midió el diámetro polar (DP) y ecuatorial (DE) en mm con un vernier digital TWIN-cal (IP67, Renens, Suiza), y se obtuvo la relación DP/DE para determinar la forma de las uvas.

Determinación de color

Se midió el color con un colorímetro Minolta (CR-300, Nueva Jersey, EUA) en 20 bayas (dos puntos/baya), con los valores de L*, a* y b* se calculó el tono de color ($\text{croma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) y el ángulo de matiz ($\text{hue} = \text{arcotangente}(b^*/a^*)$). El índice específico para bayas de color rojo (*color index for red grapes*, CIRG por sus siglas en inglés) se calculó con la ecuación CIRG = $180 - \text{hue} / (L^* + \text{croma})$ (Carreño *et al.*, 1995).

Determinación de antocianinas

El contenido de antocianinas se determinó en 5 repeticiones y cada repetición lo conformaron la cantidad de círculos de cáscara para obtener 1 g de muestra de las bayas a las que se les midió el color, de acuerdo con el método descrito por Peppi *et al.* (2004) y Xu *et al.* (2018), con ligeras modificaciones. Los círculos de 14 mm de diámetro de cáscara se trituraron en un mortero frío con 10 mL de metanol con HCl al 1 % (v/v) enfriado (-20 °C). Posteriormente, los extractos se colocaron en un baño ultrasónico (Branson 3510, Danbury, EUA) por 3

min en oscuridad a temperatura ambiente y una frecuencia de 45 KHz. La solución se filtró y se analizó en un espectrofotómetro (Hach DR5000, Alemania) a 530 y 657 nm. La unidad relativa se calculó mediante la fórmula $\Delta D = A_{530} - 0.25 \times A_{657}$, donde A es la absorbancia registrada. Para el cálculo se utilizó el peso molecular (PM 449.2) y la absorbancia molar (ϵ 26900) de la antocianina mayoritaria (Cianidina 3 glucósido). El contenido de antocianinas se expresó como antocianinas totales por unidad de área del fruto (mg cm^{-2}).

Extracción y cuantificación de ceras epicuticulares

En otro grupo de 100 bayas cortadas de los 15 racimos, se tomaron 10 bayas por repetición al azar y 10 repeticiones, se sumergieron en 100 mL de cloroformo (FagaLab, Sinaloa, México) se colocaron 10 bayas seleccionadas al azar a 45 °C durante 1 min en baño de agua, filtrando el líquido en papel Whatman No. 1 y depositado en vasos de precipitado tarados, la solución se evaporó hasta un volumen final de 5 mL bajo una campana de extracción (Labconco, EUA). Posteriormente, los vasos con la solución se colocaron en una estufa de convección (VWR 1320, Oregon, EUA) a 55 °C durante 12 h hasta sequedad y enfriando a temperatura ambiente dentro de un desecador. El residuo seco se pesó en una balanza analítica (Mettler AE240, Ohio, EUA). Este peso representa las ceras epicuticulares totales. El área de la cutícula se calculó multiplicando el número de bayas utilizadas por el área promedio de cutícula de cada baya (previamente determinada) y ajustadas a la unidad (Riederer y Schneider, 1990) y se expresó en mg de cera por unidad de área (mg cm^{-2}).

Extracción, peso, permeabilidad y grosor de la cutícula

La extracción se realizó siguiendo la metodología propuesta por Freeman *et al.* (1979) y Schönerr y Riederer (1986) con pequeñas modificaciones. En 20 círculos de 14 mm Diámetro de epicarpio de 10 bayas agrupadas en 4 grupos como repetición y cada grupo constó de 5 círculos, los cuales se incubaron 24 h en una disolución de 10 mL de ZnCl_2 con HCl concentrado (J.T. Baker, Madrid, España) (1 g: 1.7 mL p/v), agitando ligeramente.

Posteriormente, las cutículas aisladas se lavaron tres veces con agua ultrapura y se transfirieron a una solución de ácido bórico (H_3BO_3) al 2 % (Sigma, Missouri, EUA) durante 8 h, agitando ocasionalmente para eliminar materia orgánica, ya lavadas se colocaron en solución de H_3BO_3 al 2 % hasta su uso. Un nuevo lavado se realizó previo a pesarlas en charolas de aluminio taradas. Las cutículas se secaron en estufa de convección a 55 °C durante 30 min. El peso seco representa la cantidad de cutícula del fruto y se ajustó a mg cm^{-2} .

Para evaluar la permeabilidad y grosor de las cutículas se utilizó la técnica propuesta por Geyer y Schönherr (1990) y modificada por Báez-Sañudo *et al.* (1993). En 16 cutículas previamente extraídas se fijaron con silicona cubriendo orificios de 0.38 cm^2 sobre 4 láminas (4 repeticiones) de teflón horadadas con 4 espacios en cada lámina, las láminas se montaron en cajas Petri plásticas de 5 cm de diámetro con 5 mL de agua ultrapura. Se registró el peso del sistema en la microbalanza.

Luego, los triplicados se incubaron a temperatura ambiente (25 °C), registrando el peso cada dos horas durante 8 h (0.1 % del peso inicial). Los resultados se expresaron como mg de vapor de agua perdido por cm^2 de cutícula expuesta ($\text{mg de H}_2\text{O cm}^{-2}$).

El grosor de la cutícula se determinó con la técnica propuesta por Báez-Sañudo *et al.* (1993). Seis círculos de cutícula de 3 bayas por tratamiento lavadas con agua ultrapura fueron colocados en charolas de aluminio, secados en estufa de convección a 55 °C durante 10 min. El grosor (μm) se midió con un micrómetro digital (Mitutoyo PK-0505, Tokyo, Japón) calibrado.

Extracción y cuantificación de ceras intracuticulares

Para la extracción de las ceras intracuticulares se emplearon 16 círculos de 8 bayas colocadas en vasos con cloroformo ($\geq 200 \mu\text{L}$ por cm^2 de cutícula), se incubaron en un baño de agua a 80 °C durante 2 min. El cloroformo se filtró en papel Whatman No. 1 y transferidos a tubos de vidrio prepesados. Posteriormente, los tubos se colocaron en una estufa de convección a 55 °C hasta sequedad. Al residuo se le determinó el peso seco en una balanza analítica. La cantidad total de ceras intracuticulares se obtuvo mediante el peso del residuo seco y se expresó como mg por unidad de área de cutícula expuesta (mg cm^{-2}) (Riederer y Schneider, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso y diámetro de bayas

El peso promedio de una uva de buena calidad es de 1.5 a 3 g (Champa *et al.*, 2014), rango superado por cada uno de los tratamientos evaluados. Los tratamientos MEL, ETH2+MEL y AS+MEL presentaron diferencias significativas con respecto al TEST, mientras que los tratamientos a base de ETH y AS no presentaron diferencias significativas con respecto al TEST, sin embargo, en todos los casos las bayas tratadas con bioreguladores tuvieron mayor peso que las del TEST (Tabla 2). Lo anterior coincide con el aumento de peso de 6.6 % más respecto al testigo en el cultivar Merlot al aplicar 100 mg L^{-1} de melatonina en dos momentos del envero (Meng *et al.*, 2015), así mismo en la variedad de uva "Zaosu" (Liu *et al.*, 2019).

DP y DE muestra el mismo patrón que se observó en el peso de las bayas, debido a que los racimos tratados con MEL (20.71 mm DP y 19.20 mm DE) o en combinación ETH2+MEL (21.72 mm DP y 19.75 mm DE) y AS+MEL (21.07 mm DP y 19.67 mm DE) presentaron hasta un 10 % más que el testigo (19.14 mm DP y 17.54 mm DE, respectivamente). ETH y AS, o combinados, solo fueron mayor que testigo en un 5 % (Tabla 2).

Según la NMX-FF-026-SCFI-2006, las bayas de uva de mesa deben de presentar 19.1 mm de DE para clasificarla como categoría extra. Las bayas tratadas con MEL, ETH2+MEL, AS+MEL y ETH+AS superaron el DE mínimo requerido para la categoría extra mientras que los tratamientos TEST, ETH1, ETH2 y AS presentaron valores por debajo de este. El valor DP/DE fue cercano a 1 en todos los tratamientos, valor característico a la variedad estudiada y forma apirénica. Dado que

Tabla 2. Efecto de la aplicación en envero de bioreguladores sobre el peso fresco, diámetro polar, ecuatorial y relación DP/DE en "Flame Seedless".

Table 2. Effect of veraison application of bioregulators on fresh weight, polar and equatorial diameter and DP/DE ratio "Flame Seedless" berries.

Tratamientos	Peso fresco (g)	DP ¹ (mm)	DE ² (mm)	Relación DP/DE ^{**}
TEST	3.75a*	19.14a	17.54a	1.09
ETH1	4.55ab	20.20ab	18.76bc	1.07
ETH2	4.33ab	20.27ab	18.29ab	1.10
AS	4.35ab	20.14ab	18.60ab	1.08
MEL	4.75bc	20.71bc	19.20bc	1.07
ETH2+AS	4.63abc	20.61bc	19.03bc	1.08
ETH2+MEL	5.46c	21.72c	19.75c	1.09
AS+MEL	5.14bc	21.07bc	19.67c	1.07

*Medias con letras minúsculas iguales en la misma columna no presentan diferencias ($p \leq 0.05$).

¹DP es diámetro polar, ²DE es diámetro ecuatorial, relación ^{**}DP/DE ≥ 1 son de forma apirénica.

la melatonina se considera análoga del ácido indol acético (AIA) por compartir el triptófano como componente inicial, pudo haber influido en el aumento del tamaño y peso de los frutos a través de la división y elongación celular (Fan *et al.*, 2018).

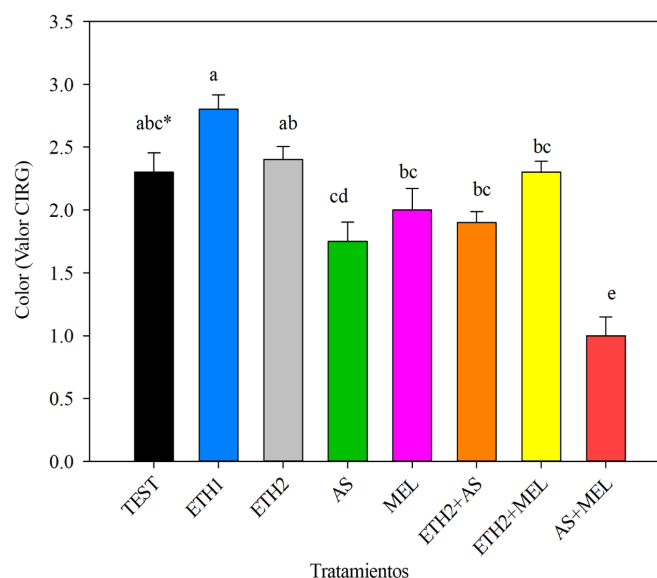
Determinación de color

De acuerdo con la NMX-FF-026-SCFI-2006, el valor mínimo requerido de color para uvas rojas de categoría extra es de 4-5 (color rojo) en el 85 % de las bayas. En el presente estudio, las bayas no alcanzaron la coloración roja para la categoría extra. La aplicación de ETH1 alcanzó un CIRG de 2.8 (rosa), similar a las bayas tratadas con ETH2 con 2.4 (rosa) estadísticamente similares al TEST (2.2, rosa). Las bayas tratadas con ETH2+AS, AS y AS+MEL con valor CIRG de 1.2 correspondiente al color verde-amarillo (Figura 1). Los valores de CIRG de los tratamientos con ETH1 y ETH2 coinciden con el 2.83 reportado por Alenazi *et al.* (2019), al aplicar en el envero 125 mg L⁻¹ y a la dosis de 250 mg L⁻¹ obtuvieron 2.90 en el cultivar Red Globe; mientras que Ochoa-Villarreal *et al.* (2011), con 0.5 mg mL⁻¹ de Ethrel en el envero del cultivar Flame Seedless obtuvieron 2.95 del CIRG 15 días después de aplicado el tratamiento, por el contrario, Gámez-Elizalde *et al.* (2020) registraron valores de 4.2 en bayas tratadas durante el envero con Ethrel a 250 mg L⁻¹ y 3.8 en AS a 100 mg L⁻¹ en el cultivar Flame Seedless y evaluados 18 días después.

El valor bajo de CIRG en las bayas pudo deberse a un retraso, por un lado, en la degradación de clorofilas por efecto del tratamiento de MEL y AS (Wu *et al.*, 2021; Yadav *et al.*, 2022) y, por otra parte, en la disminución de la acumulación de antocianinas por la influencia de la temperatura máxima presente en el momento del experimento (≥ 37 °C) (Boss y Davies, 2009; SMN, 2021).

Contenido de antocianinas

El mayor contenido de antocianinas totales se presentó en las bayas tratadas con ETH1 y ETH2 al obtenerse un contenido total de 0.021 y 0.019 mg cm⁻² respectivamente (Figura 2).



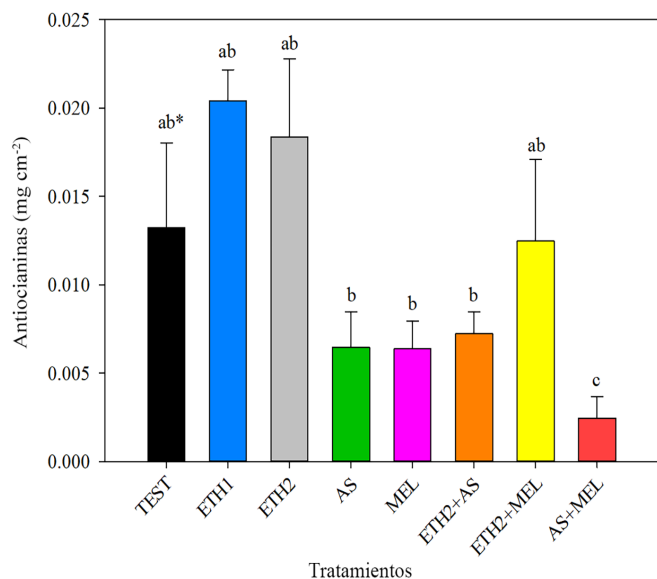
*Medias con letras minúsculas iguales en la misma columna no presentan diferencias ($p \leq 0.05$), líneas de error estándar y $n = 16$.

Figura 1. Efecto de la aplicación en envero de bioreguladores sobre el color (valor CIRG) de las bayas "Flame Seedless".

Figure 1. Effect of veraison application of bioregulators on the color (CIRG value) of "Flame Seedless" berries.

Los tratados con ETH fueron estadísticamente diferentes con todos los tratamientos a excepción del TEST (0.013 mg cm⁻²) y ETH2+MEL (0.0125 mg cm⁻²); por el contrario, las bayas tratadas con AS+MEL presentaron la más baja concentración con solo 0.002 mg cm⁻². Resultados similares reportaron Peppi *et al.* (2006) con valores de 0.017 mg cm⁻², 0.015 mg cm⁻² y 0.013 mg cm⁻² de antocianinas cuando aplicaron antes, durante y después del envero respectivamente 250 mg L⁻¹ de Ethrel en uva de mesa "Flame Seedless" en las diferentes etapas.

Se observó una relación directa entre el contenido de antocianinas totales con los valores CIRG dado que los tratamientos con mayor contenido tuvieron el mayor valor de CIRG. Esto mismo sucedió para los tratamientos con valores inferiores de CIRG y menor contenido de antocianinas. Como se mencionó, los frutos tratados con MEL y AS, o en combi-



*Medias con letras minúsculas iguales en la misma columna no presentan diferencias ($p \leq 0.05$), líneas de error estándar y $n = 4$.

Figura 2. Efecto de la aplicación en envero de bioreguladores sobre el contenido de antocianinas en bayas de uva "Flame Seedless".

Figure 2. Effect of veraison application of bioregulators on anthocyanin content in "Flame Seedless" grape berries.

nación, pudieron recibir un estímulo distinto en el desarrollo retardando la madurez, una biosíntesis de antocianinas y degradación de las clorofilas más lenta, así como incrementando el tamaño y peso de las bayas (Wu *et al.*, 2021; Yadav *et al.*, 2022); comportamiento típico de frutos no climatéricos que requieren momentos específicos de aplicación como se demostró en cereza dulce (Miranda *et al.*, 2020).

Contenido de ceras epicuticulares, ceras intracuticulares, cutícula, permeabilidad y grosor

El tratamiento TEST presentó el mayor contenido de ceras epicuticulares (0.64 mg cm^{-2}), sin embargo, solo se observaron diferencias estadísticas entre este y los tratamientos ETH1, ETH2 y AS (0.40 mg cm^{-2}) (Tabla 3).

Por el contrario, el contenido de ceras intracuticulares presentó resultados inversos a las epicuticulares dado que en TEST se obtuvieron menor contenido de estas (0.32 mg cm^{-2}), sin que existieran diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 3), esto pudiera ser explicado desde el punto que existen diferencial en la deposición y tipo de compuestos en ambas clases de ceras y su deposición pudiera ser asincrónica (Buschhaus y Jetter, 2011), además también pudo presentarse ligeras lixiviaciones de las ceras epicuticulares por efecto de la aplicación de las mezclas con surfactante. Los resultados coinciden con los reportados por Yang *et al.* (2021), que analizaron el contenido de ceras epicuticulares en la etapa de maduración de las bayas en las variedades de Kyoho, Red Globe y Moscatel de Hamburgo reportando un contenido de 342.9 , 154 y 119.6 mg cm^{-2} , respectivamente. De acuerdo con los resultados se deduce que los valores del contenido de ceras tanto epi como intracuticulares se deben a un efecto de la ontogenia del fruto (Pensec *et al.*, 2014) y no por efecto sistémico de los tratamientos.

El peso promedio de las cutículas de las bayas tratadas con ETH2, AS y MEL fue de 0.33 , 0.31 , 0.31 mg cm^{-2} estadísticamente similares ($p \leq 0.05$) con ETH2+AS, ETH2+MEL y AS+MEL, pero diferentes significativamente al TEST (0.23 mg cm^{-2}). Los valores de permeabilidad no tuvieron diferencias significativas entre el TEST ($3.62 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y el resto de los tratamientos aun cuando el AS + MEL alcanzó el mayor nivel ($4.64 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$); debido a la no diferencia en el contenido de ceras intracuticulares (Tabla 2).

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para el grosor de la cutícula. Se ha reportado que el grosor de la cutícula está en función del estado de desarrollo y tamaño final de baya. El grosor de la cutícula se incrementa con el crecimiento y disminuye durante la maduración (Jetter *et al.*, 2006), lo cual pudo coincidir con la aplicación de la melatonina que al retrasar la maduración e incrementar el tamaño final de las bayas, se observó un mayor grosor (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la aplicación en envero de bioreguladores sobre características de la cutícula y concentración de las ceras epi e intracuticulares de las bayas "Flame Seedless".

Table 3. Effect of veraison application of bioregulators on cuticle on characteristics and concentration of epi- and intracuticular waxes of "Flame Seedless" berries.

Tratamientos	Ceras epicuticulares (mg cm^{-2})	Cutícula (mg cm^{-2})	Ceras intracuticulares (mg cm^{-2})	Permeabilidad ($\text{mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Grosor (μm)
TEST	0.64b*	0.23a	0.32a	3.62a	0.073a
ETH1	0.40a	0.28ab	0.46a	3.92a	0.085a
ETH2	0.40a	0.32b	0.47a	3.68a	0.082a
AS	0.40a	0.31b	0.60a	3.84a	0.083a
MEL	0.53ab	0.31b	0.50a	4.09a	0.088a
ETH2+AS	0.51ab	0.27ab	0.51a	4.31a	0.075a
ETH2+MEL	0.44ab	0.27ab	0.48a	3.95a	0.080a
AS+MEL	0.52ab	0.26ab	0.35a	4.64a	0.078a

*Medias con letras minúsculas iguales en la misma columna no presentan diferencias ($p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se observó que la aplicación comercial de Ethrel estimula la biosíntesis de antocianinas y por consecuencia el incremento del valor CIRG sin llegar al valor óptimo en la coloración roja de la uva de mesa "Flame Seedless" requerido para el mercado de exportación, bajo las condiciones del desierto de Sonora. Mientras que el efecto de la aplicación precosecha de AS, MEL y en combinación estimularon el crecimiento del fruto reflejado en un mayor peso y tamaño, generando bayas con mayor calibre y peso, pero tardío en la acumulación de antocianinas sugiriendo una menor madurez. En general, los tratamientos no afectaron las concentraciones de ceras intracuticulares, y epicuticulares ni las características de cantidad, grosor y permeabilidad de la cutícula.

REFERENCIAS

- Aghdam, M.S. y Fard, J.R. 2017. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chemistry*. 221: 1650-1657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.123>
- Alenazi, M.M., Shafiq, M., Alobeed R.S., Aldson A.A., Abbasi N.A., Ali I., Mubushar M. y Javed I. 2019. Application of abscisic acid at veraison improves red pigmentation and accumulation of dietary antioxidants in red table grapes cv. Red Globe at harvest. *Scientia Horticulturae*. 257: 108672. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108672>
- Arnao, M.B. y Hernández-Ruiz, J. 2019. Melatonin as a chemical substance or as phytomelatonin rich-extracts for use as plant protector and/or biostimulant in accordance with EC legislation. *Agronomy*. 9: 570. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100570>
- Báez-Sañudo, R., Tadeo, F., Primo-Millo, E. y Zacarias, L. 1993. Physiological and ultrastructural changes during the ripening and senescence of clementine mandarin. *Acta Horticulturae*. 343: 18-24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.343.4>
- Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J.N., González-García, L. E., Sánchez-Estrada, A., y González-León, A. 2021. Cambios en las antocianinas y el etileno residual de uva de Mesa tratada con promotores del color. *Revista Iberoamericana de Postcosecha*. 2: 166-177. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81369610004>
- Boss, P.K. y Davies, C. 2009. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries. En: *Grapevine molecular physiology & biotechnology*, 2da ed. Roubelakis-Angelakis K.A (ed.), pp 265-266 pp. Springer Science Business Media B.V., Dodercht.
- Buschhaus, C., y Jetter, R. 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces?. *Journal of Experimental Botany*. 62: 841-853. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq366>
- Carbonell-Bejerano, P. y Martínez-Zapater, J.M. 2013. Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. *ACE Revista de Enología*. [Consultado 15 junio 2021]. Disponible en: https://www.acenologia.com/estructura_composicion_vino_cienc1013/
- Carreño, J., Martínez, A., Almela, L. y Fernández-López, J.A. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. *Food Research International*. 28(4): 373-377. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)00008-A](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)00008-A)
- Champa, W.H., Gill, M.I.S., Mahajan, B.V.C. y Arora, N.K. 2014. Pre-harvest treatments of brassinosteroids on improving quality of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedles. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 2: 97-104.
- Crupi, P., Antonacci, D., Savino, M., Genghi, R., Perniola, R. y Coletta, A. 2016. Girdling and gibberellic acid effects on yield and quality of a seedless red table grape for saving irrigation water supply. *European Journal of Agronomy*. 80: 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.06.015>
- Deluc, L.G., Quilici, D.R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M.D. Schlauch, K.A., Mérillon, J.M., Cushman, J.C. y Cramer, G.R. 2009. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*. 10: 212-233. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-212>
- Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z. y Chen, L. 2018. A review: Melatonin: A Multifunctional Factor in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>
- Ferrara, G., Mazzeo, A., Matarrese, A.M.S., Pacucci, C., Pacifico, A., Gambacorta, G., Faccia, M., Trani, A., Gallo, V., Cafagna, I. y Mastroianni, P. 2013. Application of abscisic acid (S-ABA) to 'crimson seedless' grape berries in a Mediterranean climate: Effects on color, chemical characteristics, metabolic profile, and S-ABA concentration. *Journal Plant Growth Regulation*. 32: 491-505. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9316-2>
- Freeman, B., Albrigo, L.G. y Biggs, R.H. 1979. Ultrastructure and chemistry of cuticular waxes of developing citrus leaves and fruit (Oranges, tangerines, lemons). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 104(6): 801-808.
- Gámez-Elizalde, M., Mercado-Ruiz, J.N., García-Robles, J.M. y Báez-Sañudo, R. 2020. Interacción del ácido salicílico y el pH en la coloración de uva de mesa "Flame Seedless". *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 21: 68-77. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81363356006>
- Geyer, U. y Schönherr, J. 1990. The effect of the environment on the permeability and composition of citrus leaf cuticles. Water permeability of isolated cuticular membranes. *Planta*. 180: 147-153.
- Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M. y Castillo, S. 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chemistry*. 160: 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.107>
- Habibi, G. 2017. Impact of salicylic acid on phenolic metabolism and antioxidant activity in four grape cultivars during cold storage. *International Journal Horticultural Science and Technology*. 4: 217-228. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2017.229916.185>
- Hueso, J.J. 2012. Manejo y técnicas de cultivo en uva de mesa apirena. *Fundación Cajamar. España*. 27 pp.
- Janda, T., Gondor, O.K., Yordanova, R., Szalai, G. y Pál, M. 2014. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta physiologicae plantarum*, 36: 2537-2546. DOI 10.1007/s11738-014-1620-y

- Jetter, R., Kunst L. y Samuels, L. 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: *Biology of the Plant Cuticle*. Riederer M. y Müller C. (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. 145-175 pp.
- Kaur, M, Gill, M.I.S. y Arora, N.K. 2013. Effect of pre-harvest treatment on yield, maturity and quality of "Flame Seedless" grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Horticultural Sciences*. 8: 35-40.
- Leguizamón, G.M., González-León, A., Sotelo-Mundo, R., Islas-Osuna, M., Bringas-Taddei, E. García-Robles, M. y Báez-Sañudo, R. 2008. Efecto de luminosidad y temperatura sobre color y parámetros de calidad en uvas rojas para mesa (*Vitis vinifera* L.). *Fitotecnia Mexicana*. 31: 7-17. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.1.7>
- Liu, J., Yue, R., Si, M., Wu, M., Cong, L., Zhai, R., Yang, C., Wang, Z., Ma, F. y Xu, L. 2019. Effects of exogenous application of melatonin on quality and sugar metabolism in 'Zaosu' pear fruit. *Journal of Plant Growth Regulation*. 38: 1161-1169. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09921-0>
- Meng, J.F., Xu, T.F., Song, C.Z., Yu, Y., Hu, F., Zhang, L., Zhang, Z.W. y Xi, Z.M. 2015. Melatonin treatment of pre-veraison grape berries to increase size and synchronicity of berries and modify wine aroma components. *Food Chemistry*. 185: 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.140>
- Miranda, S., Vilches, P., Suazo, M., Pavez, L., García, K., Méndez, M.A., González, M., Meisel, L.A., Defilippi, B.G. and Del Pozo, T. 2020. Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. *Food Chemistry*. 319: 126360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126360>
- Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S., Cavallini, E., D'Inca, E., Tornielli, G.B. y Filippetti, I. 2016. The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Journal Plant Research*. 129: 513-526. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0786-3>
- NMX-FF-026-SCFI-2006. Productos Alimenticios no Industrializados para Uso Humano – Fruta Fresca– Uva de Mesa (*Vitis Vinifera* L.) – Especificaciones (Cancela A La Nmx-FF-026-1994-Scfi). [Consultado 14 de mayo de 2018] 2006. Disponible en: https://caisatech.net/uploads/XXI_2_MXD_C107_NMX-FF-026-SCFI-2006_R0_7ABR2006.pdf
- Ochoa-Villarreal, M., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A., González-Aguilar, G. y Martínez-Téllez, M.A. 2011. Pectin-derived oligosaccharides increase color and anthocyanin content in "Flame Seedless" "Flame Seedless" grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91: 1928-1930. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4412>
- Oraei, M., Panahirad, S., Zaare-Nahand, F. y Gohari, G. 2019. Pre-veraison treatment of salicylic acid to enhance anthocyanin content of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 99: 5946-5952. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9869>
- Pensec, F., Paczkowski, C., Grabarczyk, M., Wóznia, A., Bernard-Gellon, M., Bertsch, C., Chong J. y Szakiel A. 2014. Changes in the triterpenoid content of cuticular waxes during fruit ripening of eight grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars grown in the upper Rhine Valley. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 62: 7998-8007. <https://doi.org/10.1021/jf502033s>
- Peppi, M.C. 2004. Color development studies in table grapes. MS Thesis. University of California, Davis.
- Peppi, M.C., Fidelibus, M.W. y Dokoozlian, D. 2006. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of Flame Seedless grapes. *Hortscience*. 41: 1440-1445. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.6.1440>
- Riederer, M. y Schneider, G. 1990. The effect of environment in the permeability and composition of citrus leaf cuticles II. Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties. *Planta*. 180: 154-165.
- SAS Institute Inc. 2012. The SAS system for windows release 9.3 version. Cary, N.C. USA.
- Schönherr, J. y Riederer, M. 1986. Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell and Environment*. 9: 459-466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1986.tb01761.x>
- Seymour, G.B., Ostergaard, L., Chapman, L.H., Knapp, S. y Martin, C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review Plant Biol.* 64: 219-41. 10.1146/annurev-arplant-050312-120057
- SMN. 2021. Sistema Meteorológico Nacional. [Consultado 7 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/smn>.
- Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., Zhang, L., Tan, D. y Guo, Y. 2016. A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato. *Journal of Pineal Research*. 61:138-153. <https://doi.org/10.1111/jpi.12315>
- Tafolla-Arellano, J.C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M.E. Zacarias-García, L. y Báez Sañudo, R. 2013. Composición, Fisiología y Biosíntesis de la Cutícula en Plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 3-12.
- Trivedi, P., Nguyen, N., Hykkerud, A.L., Häggman, H., Martinussen, I., Jaakol, L. y Karppinen, K. 2019. Developmental and environmental regulation of cuticular wax biosynthesis in fleshy fruits. *Front. Plant Science*. 10: 431. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00431>
- Wu, C., Cao, S., Xie, K., Chi, Z., Wang, J., Wang, H., Wei, Y., Shao, X., Zhang, C., Xu, F. and Gao, H., 2021. Melatonin delays yellowing of broccoli during storage by regulating chlorophyll catabolism and maintaining chloroplast ultrastructure. *Postharvest Biology and Technology* 172: 111378. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111378>
- Xu, L., Yue, Q., Xiang, G., Bian, F. y Yao, Y. 2018. Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H₂O₂, and particularly ethylene. *Horticulturae Research*. 5:41. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0045-y>
- Yadav, N., Singh, A.K., Emran, T.B., Chaudhary, R.G., Sharma, R., Sharma, S. and Barman, K., 2022. Salicylic Acid Treatment Reduces Lipid Peroxidation and Chlorophyll Degradation and Preserves Quality Attributes of Pointed Gourd Fruit. *Journal of Food Quality*, 2022: D 2090562. <https://doi.org/10.1155/2022/2090562>
- Yang, M., Luo, Z., Gao, S., Belwal, T., Wang, L., Qi, M., Ban, Z., Wu, B., Wang, F. y Li, L. 2021. The chemical composition and potential role of epicuticular and intracuticular wax in four cultivars of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 173: 111430. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111430>
- Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., Li, S., Zhang, L., Qi, Y., Ren, S., Zhao, B. y Guo, Y. 2016. Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers Plant Science*. 7: 197. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00197>



Evaluación de la diversidad de la vegetación nativa y la caracterización de la ganadería caprina en una localidad de la Reserva de Biosfera Tehuacán-Cuicatlán

Evaluation of the native vegetation diversity and characterization of goat farming in a locality of the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve

Joseph Manzano-Duran¹, Luis M. García-Feria^{3*}, Salvador Mandujano-Rodríguez²

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana-Tuxpan. Carretera Tuxpan Tampico Kilómetro 7.5, Universitaria, C.P. 92870, Tuxpam de Rodríguez Cano, Veracruz, México.

² Red Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec, No. 351, C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México.

³ Secretaría Técnica. Instituto de Ecología A.C. Carretera antigua a Coatepec, No. 351, C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México.

RESUMEN

La ganadería caprina en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) han sido un factor de transformación del hábitat. La pérdida de diversidad vegetal y el deterioro de la cobertura vegetal se puede ver reflejado en la condición corporal de las cabras al ingerir especies de menor calidad. El objetivo de este estudio fue la estimación de la diversidad vegetal de los sitios de pastoreo en San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, así como la capacidad de carga entre estaciones y la condición corporal de las cabras. Por medio de transectos se registraron 53 especies vegetales, 36 son consumidas por las cabras y algunas bajo categorías de riesgo. El tamaño de los rebaños fue de 30 ± 26 cabras y el tiempo promedio de pastoreo es de $5 \pm 0:53$ h. El peso de las cabras no fue diferente entre estaciones, pero la condición corporal fue mayor en la estación lluviosa reflejando mediana calidad (2 puntos). La capacidad de carga (96 cabras·ha⁻¹ durante 152 d en la estación lluviosa y 18 cabras·ha⁻¹ durante 213 d en la seca) y el tiempo de pastoreo indican que no hay sobrepastoreo. Se recomienda calcular la capacidad de carga con base en los requerimientos específicos de las cabras, composición química de las plantas más consumidas y su productividad, para disminuir los impactos en la diversidad vegetal.

Palabras clave: Capacidad de carga, vegetación nativa, tamaño rebaño, tiempo pastoreo.

ABSTRACT

Goat farming in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve (RBTC) has been a factor in the habitat transformation. The loss of plant diversity and the deterioration of vegetation coverage can be reflected in the body condition of goats due to the intake of lower quality vegetal species. Our objectives were to assess the plant diversity of the grazing sites in San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, as well as the carrying capacity between seasons and the body condition of the goats. Through transects in the grazing sites, 53 plant species were recorded, 36 are consumed by goats and some in risk categories. The average herd size is 30 ± 26 goats, and the average

grazing time is $5 \pm 0:53$ h. The body weight of the goats was not different between the seasons, but the body condition was higher in the rainy season, reflecting medium quality (2 points). Both the carrying capacity (96 goats·ha⁻¹ during 152 d in the rainy season and 18 goats·ha⁻¹ during 213 d in the dry season) and grazing time indicate that there is no overgrazing. It is recommended to calculate the optimal carrying capacity based on the goats specific requirements, plants chemical composition and their productivity, to reduce the impacts on the plant diversity.

Key words: Carrying capacity, grazing time, herd size, native vegetation.

INTRODUCCIÓN

Las Reservas de la Biosfera son una alternativa de conservación de la biodiversidad y del patrimonio natural con desarrollo sustentable, no obstante, las actividades agropecuarias han afectado los procesos ecosistémicos en algunas áreas protegidas (CONANP, 2013). En la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC), hasta el año 2000, el 14.69% de su superficie ha sido transformada por las actividades humanas incluidas las ganaderas (CONANP y FMCN, 2003). Sin embargo, la ganadería caprina ha sido parte del desarrollo cultural local y forma de vida de las comunidades indígenas desde la colonización española (Baraza *et al.*, 2008).

Dentro de la RBTC, en la comunidad San Gabriel Casa Blanca (SGCB), Oaxaca, la mayoría de los rebaños caprinos son pequeños y son llevados a tierras poco productivas con rutas fijas de pastoreo (Pérez-Solano y Mandujano, 2018) consumiendo hasta 100 especies vegetales (Mandujano *et al.*, 2019). Sin embargo, el sobrepastoreo ha llevado a problemas de erosión en la RBTC (CONANP, 2013), nuestra hipótesis es que el sobrepastoreo disminuye la disponibilidad del alimento y se refleja en la reducción de la condición corporal de los animales. En este sentido, se evaluó la diversidad de plantas de los sitios de pastoreo y el tiempo de ocupación por los rebaños en San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, así como la condición corporal y la capacidad de carga en las estaciones seca y lluviosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

La comunidad de SGCB, municipio de San Antonio Nanahuatipam, Oaxaca (17°39'-18°53'N y 96°55'-97°44'O), tiene una superficie de 5900 ha⁻¹ dentro de la RBTC (Figura 1). El clima es caluroso semidesértico con temperatura anual de 25 °C a 30 °C y la mayor precipitación ocurre en verano con 438 mm (CONANP, 2013); la estación seca comprende de enero a junio y la lluviosa de julio a diciembre. La vegetación es selva baja caducifolia y matorral crasicaule, con pequeñas áreas de pastizal inducido y cultivos (CONANP y FMCN, 2003; CONANP, 2013).

Caracterización de rebaños, sitios de pastoreo y tiempo de ocupación

Mediante entrevistas y observaciones directas a los seis productores de la comunidad SGCB se recabó información de las características del rebaño (número de hembras, hem-

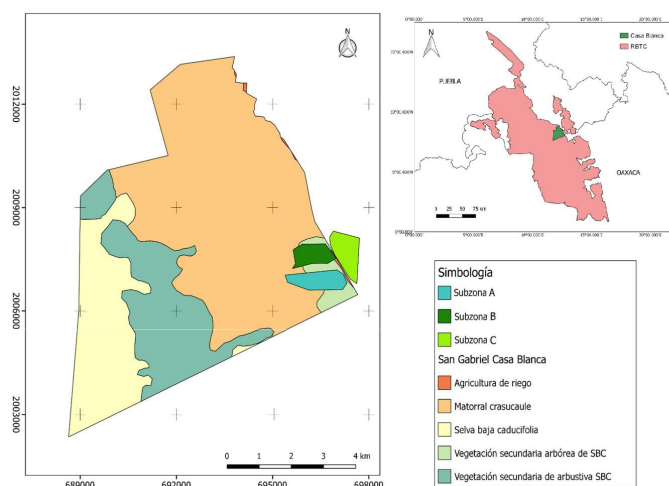


Figura 1. Tipos de vegetación y zonas de pastoreo de la comunidad San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.
Figure 1. Types of vegetation and grazing areas of the San Gabriel Casa Blanca community, Oaxaca, Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve.

bras con cría, machos y juveniles; Tabla 1), y las actividades y características del pastoreo entre febrero y octubre del 2017. Se registró el tiempo de duración del pastoreo y las especies vegetales consumidas. Además, se tomaron coordenadas geográficas en diferentes puntos de la ruta de pastoreo para estimar el área, y en cada punto, se registraron las especies vegetales y su frecuencia en tres transectos de 50 m de longitud. La dominancia fue evaluada con curvas de Whittaker y la diversidad con el índice de Simpson (λ) (Magurran, 2004); se compararon los sitios con una prueba de t con ajuste de Hutcheson.

Evaluación de la condición corporal

La condición corporal fue evaluada en diez cabras seleccionados al azar para cada rebaño. Sesenta cabras (17 adultas, 33 juveniles y 10 crías) fueron pesadas en ambas estaciones y la condición corporal fue estimada con la asignación de puntos, donde la puntuación 1.- pobre rendimiento en carne; puntuación 2.- rendimiento moderado de carne; puntuación 3.- contenido medio de grasa en las zonas palpadas, y, por último, la puntuación 4.- gran acumulación de grasa (McGregor, 2012). El desarrollo corporal y de crecimiento se midió con la anchura de los hombros (AH), el perímetro torácico (PT) y el diámetro dorso esternal (DDE) (Bezerra *et al.*, 2012) y se compararon entre estaciones usando los intervalos de confianza al 84 % siguiendo los criterios de MacGregor-Fors y Payton (2013).

Estimación de la capacidad de carga

De acuerdo con la superficie del área de pastoreo estimada se calculó la cantidad de materia seca (MS) en kg·ha⁻¹ para ambas estaciones con los valores de MS obtenidos por Barrera-Salazar (2015), quien reporta para la estación lluviosa 6.64 g MS·m² (66.4 kg MS·ha⁻¹) y para la estación seca 1.72 g MS·m² (17.2 kg MS·ha⁻¹). Posteriormente se calculó la capacidad de carga (K), en número de individuos por hectárea, con la ecuación:

$$K = \frac{FD}{C * d}$$

Tabla 1. Estructura sexo-edad de los rebaños caprinos de la comunidad San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca. n = número de individuos; DE = Desviación estándar.
Table 1. Sex-age structure of the goat's herds of the San Gabriel Casa Blanca community, Oaxaca. n = number of individuals; DE = Standard deviation.

Rebaño	Tamaño de rebaño	Hembras	Machos	Relación H/M	Hembras preñadas	Hembras con cría	Juveniles
R1	13	10	3	3.3	1	1	5
R2	40	28	12	2.3	15	5	20
R3	21	16	5	3.2	5	4	4
R4	14	10	4	2.5	-	-	3
R5	14	9	5	1.8	2	-	-
R6	80	53	27	1.9	20	8	30
n	182	126	56	-	43	18	62
Media	30.3	21.0	9.3	2.5	8.6	4.5	12.4
DE	26.4	17.2	9.2	0.6	8.4	2.9	12.1

donde, el FD es el forraje disponible en kg MS·ha⁻¹ del área de pastoreo; C es el consumo de forraje en kg MS para una cabra adulta (1.5 kg MS, según Nagel et al., 2011) multiplicado por los días de pastoreo *d* (213 d de estación seca y 152 d de lluviosa). El cálculo del número de cabras por subzona de pastoreo y entre estaciones fue comparado con una prueba de t para muestras independientes ($P < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa PAST 3.17 (Hammer et al., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los rebaños, sitios de pastoreo y tiempo de ocupación

Mediante las entrevistas a los seis caprinocultores en la comunidad SGCB se detectó que el pastoreo es extensivo en 246.1 ha⁻¹ de las 328.3 ha⁻¹ establecidas por la administración de la RBTC. La zona de pastoreo está dividida en dos subzonas (Subzona A de 89.2 ha⁻¹ y Subzona B de 86.1 ha⁻¹) y es considerada una tercera área (subzona C) de 70.8 ha⁻¹ fuera de la zona de pastoreo (Figura 1). La raza criolla es la más común; el tamaño promedio del rebaño fue de 30.3 ± 26.4 cabras y no rebasa el número de cabras permitido (100 cabras). En un censo realizado en el 2015 (Barrera-Salazar, 2015) reportaron la existencia de cinco rebaños con un tamaño promedio de 24 cabras (con un mínimo de 5 cabras y un máximo de 40), esto sugiere que el número de cabras por rebaño se ha incrementado. Los rebaños están compuestos en promedio por 9.3 ± 9.2 machos, 21 ± 17.2 hembras y 12.4 ± 12.1 juveniles. La relación hembra/macho promedio es de 2.5 ± 0.6 (Tabla 1), siendo menor a la relación 1:10 recomendada para caprinos (Carrillo et al., 2007), o lo manejado en otras zonas cercanas a SGCB desde 1:12 (Abrego, 2013) hasta 1:18 (Mendoza y Ortega, 2009).

Las rutas de pastoreo son elegidas por el pastor, pasando por cerros, barrancas, orillas de camino, orillas de río y zonas de cultivo de caña (Pérez-Solano y Mandujano, 2018). La hora de inicio del pastoreo para cuatro rebaños fue a las 10:00 h y el término entre 14:00 h y 15:00 h, sin embargo, otros pastores inician a las 13:00 h y regresan a las 20:00 h. En promedio las cabras pastan 5:00 ± 0:53 h, dentro de los rangos estimados para la región de la Cañada (4.6 h en estación húmeda, Barrera-Salazar, 2015; 4.2 h, Mandujano et al., 2019), pero menor a lo reportado para zonas cercanas (8 h, Abrego, 2013; 10 h; Mendoza y Ortega, 2009).

Durante las rutas de pastoreo 36 especies vegetales fueron consumidas por las cabras, entre otras, *Opuntia* sp. de la cual consumen flores y frutos, de *Mimosa* sp. las hojas y las ramas, de la *Ceiba parvifolia* la flor y el fruto. *Mimosa* sp. y *Opuntia* sp. fueron de las plantas más consumidas en las tres subzonas de pastoreo, obteniendo resultados similares a Mandujano et al. (2019), quienes registraron que las cabras llegan a consumir retoños, hojas, flores y frutos no maduros de hasta 84 especies vegetales, de las cuales 30 especies forman parte del 75 % de la dieta.

La vegetación en las tres subzonas va desde matorral crausicaule a selva baja caducifolia. En los transectos se

contabilizaron 53 especies de plantas, teniendo la subzona A 19 especies, siendo *Hechtia tehuacana* la especie dominante (Figura 2); en la subzona B se registraron 32 especies, con dominancia de *Sanvitalia procumbens*; y en la subzona C se registraron 15 especies, con dominancia de *Opuntia pubescens*. No se pudieron clasificar 18 especies debido a la baja abundancia y/o a la falta de estructuras (flores o frutos) para su identificación.

La subzona B tuvo el valor más alto de diversidad vegetal ($\lambda = 0.899$), seguido de la subzona A ($\lambda = 0.892$) y la subzona C ($\lambda = 0.867$) y no hubo diferencias significativas entre ellas (subzona A/subzona B, $P = 0.56$; subzona A/subzona C, $P = 0.54$; y subzona B/subzona C, $P = 0.42$). La subzona B tiene mayor visita de cabras, que consumen flores y frutos de *Agave macroacantha* y *Mammillaria haageana* que están listadas bajo alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2019) poniendo en peligro la reproducción de estas plantas.

Evaluación de la condición corporal de los rebaños

El peso de las cabras adultas en la estación seca fue de 46.8 ± 14.7 kg (IC 84 % = 6.2) y para la estación lluviosa de 47.1 ± 14.0 kg (IC 84 % = 4.8), aunque no hubo cambios significativos entre estaciones ($P < 0.05$), es mayor al peso registrado en otras regiones de la mixteca poblana para animales de venta en pie (30 a 40 kg; Hernández et al., 2001). Los requerimientos nutricionales pueden ser compensados por la diversidad de especies vegetales disponibles, por ejemplo, las cabras de pastoreo libre y suplementadas con *Opuntia*, *Agave*, *Yucca*,

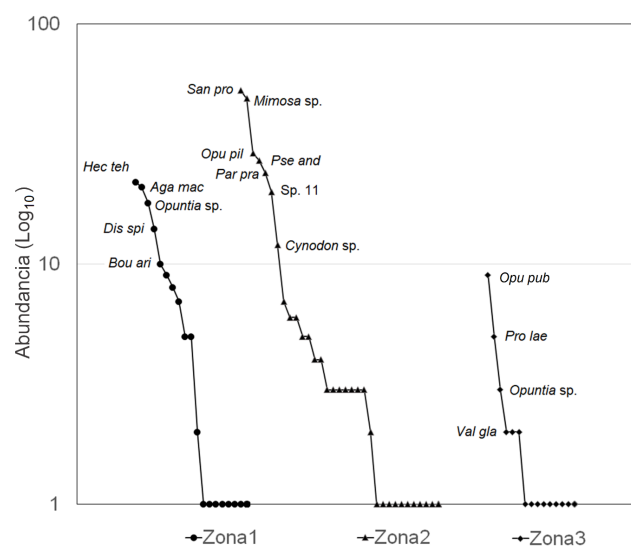


Figura 2. Curvas de rango-abundancia o de Whittaker de las comunidades vegetales de tres subzonas de pastoreo en San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca. **Figure 2.** Range-abundance or Whittaker plot of three grazing subzones plant communities in San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca.

Hec tec = *Hechtia tehuacana*, *Aga mac* = *Agave macroacantha*, *Dis spi* = *Distichlis spicata*, *Bou ari* = *Bouteloua aristoides*, *San pro* = *Sanvitalia procumbens*, *Opu pil* = *Opuntia pilifera*, *Pse and* = *Pseudosmodium andrieuxii*, *Par pra* = *Parkinsonia praecox*, *Opu pub* = *Opuntia pubescens*, *Pro lae* = *Prosopis laevigata*, *Val gla* = *Vallesia glabra*.

Prosopis y *Acacia* en la estación seca reducen o minimizan la pérdida de peso y de condición corporal (Baraza *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2012). Los rebaños de cabras en SGCB consumen *Opuntia* sp., *Mimosa* sp., *Prosopis* sp. y *Ziziphus* sp. que son muy buscados en la estación seca (Mandujano *et al.*, 2019), razón por la cual se sugiere que el peso de los animales no presente una variación notable entre las estaciones.

Según el indicador del grado de engorde (McGregor, 2012) muestra que las cabras son de mediana calidad (puntaje 1.94 ± 0.6), ya que a la palpación los procesos espinales se diferencian y fueron algo redondeados. Dos rebaños mantuvieron un puntaje mayor a 2 en ambas estaciones. En el subtrópico mexicano, las cabras bien alimentadas presentan una condición corporal por arriba de los 2.3 puntos, y las mal alimentadas logran los 1.5 puntos (Aguilar, 2008). En ocasiones en la estación seca, la condición corporal llega a disminuir por la escasez del forraje y las cabras tienen que realizar rutas de pastoreo más largas para obtener su alimento (Pérez-Solano y Mandujano, 2018). El promedio de las variables morfométricas en la estación seca para las cabras adultas fue de 2 ± 0.6 puntos de estado de carnes (IC 84 % = 0.3), AH de 18.8 ± 3.5 cm (IC 84 % = 1.5), PT de 70.1 ± 13.6 cm (IC 84 % = 5.8) y DDE con 84.0 ± 14.1 cm (IC 84 % = 6.0). Para la estación lluviosa el estado de carnes promedio tuvo un puntaje de 2 ± 0.6 (IC 84 % = 0.2), la AH fue de 28.8 ± 5.4 cm (IC 84 % = 1.8), PT de 79.4 ± 14.9 cm (IC84 % = 5.1) y DDE de 91.1 ± 15.6 cm (IC84 % = 5.3). La anchura de los hombros, el perímetro torácico y el diámetro dorso-esternal tendieron a ser mayores en la estación de lluvias (AH: $P < 0.05$; PT: $P = 0.01$; DDE: $P = 0.04$) cuando la vegetación es más abundante y los recorridos de pastoreo de las cabras son más cortos (Pérez-Solano y Mandujano, 2018). Por el contrario, en la estación seca la disponibilidad de nutrientes es crítica y obliga al ganado a consumir plantas con bajo contenido nutricional y alto contenido en metabolitos secundarios (Baraza *et al.*, 2008), lo que puede limitar el crecimiento y engorda de los animales (Mandujano *et al.*, 2019). No obstante, se ha reportado que las concentraciones bajas de taninos pueden tener efectos positivos en la digestión y la obtención de nutrientes (p.e. incremento en la cantidad de proteína de sobrepaso), ya que los caprinos tienen la capacidad de consumir plantas taniníferas y obtener nutrientes básicos para su supervivencia (Torres-Acosta *et al.*, 2008).

Evaluación de la capacidad de carga y su impacto en la zona de pastoreo

Aunque se han realizado algunos estudios de vegetación y alimentación de rebaños de cabras en la región de la Cañada (Mandujano *et al.*, 2019), no se han realizado estimaciones de la capacidad de carga, ni una valoración de la presión que ejerce el pastoreo en la vegetación nativa. Comúnmente la capacidad de carga está basada en el coeficiente de agostadero con base en la vegetación nativa y en años con precipitación normal, que para Oaxaca es de 4.12 ha^{-1} . Unidad Animal al año (COTECOCA, 2014) (1UA = vaca de 400 - 450 kg; una cabra equivale a 0.17 UA; SAGARPA, 2000); considerando este valor, la vegetación en la SGCB puede sostener $1.43 \text{ cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$ al año en forma permanente y sin deteriorar los recursos naturales. La vegetación cambia no solamente entre años sino entre estaciones por la disponibilidad de lluvias y la fenología de las plantas, esto hace que las cabras tengan que moverse más en la estación seca para cubrir sus requerimientos (Pérez-Solano y Mandujano, 2018). En el tiempo de investigación se observó que 74 cabras (3 rebaños) pastan en la subzona A; a la subzona B solo van 94 cabras (2 rebaños), y en la subzona C únicamente fue visitado por 14 cabras (Tabla 2).

La capacidad de carga en el área estimada por las rutas de pastoreo fue de $72 \text{ cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$ para la estación lluviosa y de $13 \text{ cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$ para la seca. De acuerdo con la materia seca disponible y su consumo, para la zona de pastoreo asignada (328.33 ha^{-1}) la capacidad de carga en la estación lluviosa fue de $96 \text{ cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$ y de $18 \text{ cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$ para la estación seca estando ambas por debajo del total de cabras de los seis rebaños censados (Tabla 1 y Tabla 2). El número de cabras en pastoreo tuvieron diferencias entre estaciones ($P < 0.05$), pero no entre subzonas (SZ1/SZ2: $P = 0.97$; SZ1/SZ3: $P = 0.84$; SZ2/SZ3: $P = 0.86$), no obstante, la capacidad de recuperación de la vegetación y la sequía que se da por la temporalidad, la capacidad de carga estimada es suficiente para evitar un sobrepastoreo. Aunque las cabras son altamente adaptables a condiciones de escasa vegetación, las afectaciones ambientales por la caprinocultura son evidentes cuando las prácticas de manejo no son adecuadas (Rosa-García *et al.*, 2012). Se ha documentado que las cabras pueden ser fuertes competidores por alimento con los herbívoros silvestres por su forma de consumo no selectivo (Rosa-García *et al.*, 2012),

Tabla 2. Estimaciones de la capacidad de carga de ganado caprino en tres subzonas de pastoreo en las estaciones lluviosa y seca en San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca.

Table 2. Goat cattle load capacity estimates in three grazing subzones during the rainy and dry seasons in San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca.

Zonas	Superficie (ha^{-1})	Número de cabras	Capacidad de carga ($\text{cabras} \cdot \text{ha}^{-1}$)	
			Estación lluviosa	Estación seca
Subzona A	89.23	74	25.99	4.80
Subzona B	86.12	94	25.08	4.64
Subzona C	70.79	14	20.62	3.81
Zona de Pastoreo Estimada	246.14	182	71.68	13.25
Zona de Pastoreo Total	328.33	182	95.62	17.68

ya que consumen flores, frutos, hojas y retoños lo que hace que las plantas retarden o disminuyan su reproducción, y en consecuencia la productividad de la zona. La baja productividad, principalmente en temporadas críticas del año, puede derivar en sobrepastoreo cuando la competencia se incrementa (Bryant *et al.*, 1979; Rosa-García *et al.*, 2012). No obstante, bajo un manejo adecuado y controlado, el pastoreo puede ser compatible con algunas especies de herbívoros silvestres como el venado de cola blanca, *Odocoileus virginianus* (Bryant *et al.*, 1979; Rosa-García *et al.*, 2012).

En la estación seca se recomiendan suplementar con algunas especies vegetales nativas (Baraza *et al.*, 2008; Nagel *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016), pero debe considerarse el estado de conservación y vulnerabilidad de las plantas. Por ejemplo, en la RBTC 50 especies de plantas son endémicas y bajo una categoría de riesgo (Casas *et al.*, 2001; SEMARNAT, 2019), pero también existen aproximadamente 450 especies con potencial forrajero (Casas *et al.*, 2001). Es recomendable estimar la productividad y hacer un manejo adecuado de ellas (Casas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2016) para mitigar los posibles impactos de la caprinocultura en el ecosistema.

CONCLUSIONES

Aunque el tiempo de pastoreo fue limitado, las cabras presentaron condición corporal moderada o satisfactoria y un peso corporal con pocos cambios entre estaciones. La diversidad de plantas podría estar ayudando en el incremento del peso de las cabras y su recuperación de la condición corporal en la estación lluviosa. Además, la capacidad de carga manejada en SGCB no sobrepasa la capacidad de carga calculada, reflejándose en la condición corporal de las cabras. Se recomienda evaluar la capacidad de carga tanto en años con precipitación arriba como debajo de la media, así como con base en los requerimientos específicos de las cabras, análisis bromatológico de las especies vegetales más consumidas y su productividad, para un mejor manejo del agostadero y disminuir el impacto de la caprinocultura en este ecosistema.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo al Proyecto No.26826 otorgado a SMR. A los caprinocultores de San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, por aportar sus conocimientos y permitir acompañarlos en sus actividades ganaderas. A Adriana Sandoval Comte, Luz Adriana Pérez Solano, Odalis Mortero Montiel y Zulema Bautista por el apoyo en la colecta de datos y logística en campo.

REFERENCIAS

- Abrego, R. 2013. El sistema de producción y clasificación fenotípica de las cabras de la mixteca poblana. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Puebla, México.
- Aguilar, M. 2008. La condición corporal no afecta la actividad reproductiva de las cabras alpino del subtrópico mexicano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Saltillo, Coahuila, México.

- Baraza, E., Ángeles, S., García, A. y Valiente-Banuet, A. 2008. Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. *Interciencia*. 33(12): 891-896. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33913805.pdf>
- Barrera-Salazar, A. 2015. Estimación de la capacidad de carga del hábitat de venado cola blanca y ganado caprino en una "UMA" extensiva de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Bezerra, S.B., Chaves, A.S., Silva, D.K., Ferreira, M., Pereira, K.P., Santos, G.R., Rodrigues, A.L. y Cavalcanti de Almeida, O. 2012. Morphometry and carcass characteristics of goat submitted to grazing in the Caatinga. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41(1): 131-137. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000100020>
- Bryant, F.C., Kothmann, M.M. y Merrill, L.B. 1979. Diets of sheep, Angora goats, Spanish goats and White-tailed deer under excellent range conditions. *Journal of Range Management*. 32(6): 412-417. <https://doi.org/10.2307/3898549>
- Carrillo, E., Véliz, F.G., Flores, J.A. y Delgadillo, J.A. 2007. El decremento en la proporción macho-hembra no disminuye la capacidad para inducir la actividad estral de cabras anovulatorias. *Técnica Pecuaria en México*. 45: 319-328. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61345306>
- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J.L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R. y Rodríguez, I. 2001. Plant Resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Economic Botany*. 55(1): 129-166. <http://www.jstor.org/stable/4256396>
- CONANP. 2013. Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Secretaría de Medio Ambiente y Recurso Naturales. México. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/123_libro_pm.pdf
- CONANP y FMCN. 2003. Estimación de la tasa de transformación del hábitat en la reserva de la biosfera "Tehuacán-Cuicatlán" Periodo 1986-2000. Informe Final. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza A. C. México. https://simec.conanp.gob.mx/TTH/Tehuacan/Tehuacan_TTH_1986_2000.pdf
- COTECOCA. 2014. Comisión Técnico Consultivo de Coeficientes de Agostadero. SAGARPA. [Consultado 17 marzo 2020] Disponible en: http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D2_AGRIGAN04_06&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce&NOMBREENTIDAD=*
- Hammer, O., Harper, D.A.T. y Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 4:9. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Hernández, J.S., Rodero, E., Herrera, M., Delgado, J.B., Barba, C. y Sierra, A. 2001. La caprinocultura en la mixteca poblana (México). Descripción e identificación de factores limitantes. *Archivos de Zootecnia*. 50: 231-239.
- MacGregor-Fors, I. y Payton, M.E. 2013. Contrasting diversity values: statistical inferences based on overlapping confidence intervals. *PLOS ONE*. 8(2): e56794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056794>
- Magurran, A.E. 2004. *Measuring biological diversity*. 2nd ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.

- Mandujano, S., Barrera-Salazar, A. y Vergara-Castrejón, A. 2019. Similitud de las especies de plantas consumidas por rebaños de cabras en el bosque tropical seco de la Cañada, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10: 490-505. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4370>
- McGregor, B.A. 2012. The role of objective and subjective evaluation in the production and marketing of goats for meat. En: *Goat meat production and quality*. O. Mahgoub, I.T. Kadim y E.C. Webb (eds.), pp. 209-230. CAB International.
- Mendoza, A. y Ortega, J.L. 2009. Caracterización de la caprinocultura en el municipio de Tepelmeme Villa de Morelos, Oaxaca, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 8: 75-80. <https://www.redalyc.org/pdf/4555/455545064011.pdf>
- Nagel, P., Wurzinger, M., Iñiguez, L., Echavarría-Chairez, F.G., Flores-Nájera, M.J., Pinos, J.M., Gómez, W.J. y Zollitsch, W. 2011. Sistemas de alimentación para las cabras y evaluación cualitativa de los piensos a los que tienen acceso durante la temporada seca: dos estudios de caso del altiplano mexicano. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17: 247-258. <https://doi.org/10.5154/rchscfa.2010.09.089>
- Pérez-Solano, L.A. y Mandujano, S. 2018. Radiotelemetría GPS: aplicación en el monitoreo del ganado caprino en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca, México. *Agroproductividad*. 11(10): 63-69. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i10.1246>
- Rojas, Y.S., Lara, A., Castellón, J.L., Uribe, M. y Zaragoza, J.L. 2016. Disponibilidad forrajera de tres arbustos en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Publicación Especial*. 16: 3381-3390. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146726018>
- Rosa-García, R., Celaya, R., García, U. y Osoro, K. 2012. Goat grazing, its interactions with other herbivores and biodiversity conservation issues. *Small Ruminants Research*. 107: 49-64. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.021>
- SAGARPA. 2000. Tabla de equivalencias de ganado mayor y menor. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [Consultado 5 marzo 2020]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=2054508.
- SEMARNAT. 2019. MODIFICACIÓN del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. [Consultado 20 junio 2020]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019
- Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Díaz, M.A., Hoste, H., Sandoval-Castro, C. A. y Aguilar-Caballero, A.J. 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 9(1): 83-90. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93911227008.pdf>

Chemical modifications of galactomannans: synthesis and structure-function analysis

Modificaciones químicas de galactomananos: síntesis y análisis estructura-función

Gabriel Humberto Gómez-Rodríguez¹, Jaime Lizardi-Mendoza¹, Waldo Argüelles-Monal¹, Osiris Álvarez-Bajo², Yolanda Leticia López-Franco^{1*}

¹ Research Center for Food and Development, CIAD, A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazaran Rosas No. 46, Hermosillo 83304, Sonora, Mexico.

² Department of Physics Research, University of Sonora, Rosales and Encinas, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico.

ABSTRACT

Galactomannans (GM) are multifunctional polysaccharides made up of a β (1 \rightarrow 4)-D-mannopyranose backbone with D-galactopyranose branches linked by α (1 \rightarrow 6) glycosidic bonds. They are obtained from plants endosperm of seeds by different extraction methods. The chemical modification of polysaccharides has been used as strategy to change structural characteristics and functional properties, as solubility, polarity, ionic charge, bioactivity, and others. Reported modifications of GM includes hydrolyzation, esterification, etherification, and addition of functional groups as sulphates or phosphates producing GM derivatives with biological and technological application potentials. Therefore, this review focuses on the synthetic routes and the analysis of the structures of chemically modified GM.

Keywords: galactomannans, chemical modifications, esterification, carboxymethyl etherification, addition of functional groups

RESUMEN

Los galactomananos (GM) son polisacáridos multifuncionales formados por una cadena de β (1 \rightarrow 4)-D-manopiranosas con ramificaciones de D-galactopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 6). Se obtienen del endospermo de semillas de leguminosas por diferentes métodos de extracción. La modificación química de polisacáridos se ha utilizado como estrategia para cambiar características estructurales y propiedades funcionales, como solubilidad, polaridad, carga iónica, bioactividad, entre otras. Las modificaciones reportadas de GM incluyen hidrólisis, esterificación, eterificación y adición de grupos funcionales como sulfatos o fosfatos que originan derivados de GM con potencial de aplicación biológica y tecnológica. Por lo tanto, esta revisión se centra en las rutas sintéticas y el análisis de las estructuras de los GM modificados químicamente.

Palabras clave: galactomananos, modificaciones químicas, esterificación, carboximetilación, adición de grupos funcionales

INTRODUCTION

The plant cell wall is composed of various polysaccharides, such as cellulose, hemicelluloses, and pectin. Among these, cellulose is the most abundant, constituting 30-50 % of the total cell wall dry mass, while hemicelluloses constitute 20 - 35 % (Pauly and Keegstra, 2008). Based on their main structure, hemicelluloses are grouped into xyloglucans, xylans, and mannans. Galactomannans (GM) are included in the latter group. These are multifunctional macromolecular carbohydrates formed by D-mannopyranose main chain linked by β (1 \rightarrow 4) glycosidic bonds with D-galactopyranose branches linked to the mannan main chain by α (1 \rightarrow 6) bonds (Figure 1). The mannose/galactose ratio (M/G) varies according to the source and extraction procedures used (Sharma *et al.*, 2022).

GM are commonly obtained from arboreal legume seeds, for example carob or locust bean (*Ceratonia siliqua*), tara (*Caesalpinia spinosa*), guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.), fenugreek (*Trigonella spp*) or mesquite seeds (*Prosopis sp*) (Wielinga, 2009; López-Franco *et al.*, 2013). GM can be distinguished from each other by the M/G ratio which varies between 1.1 to 3.5 approximately. Carob gum has a M/G ratio of 3.5 (Fidan *et al.*, 2020), tara gum 3.0 (Wu *et al.*, 2015), guar and mesquite gum 1.5 (López-Franco *et al.*, 2013; Liyanage *et al.*, 2015), and fenugreek gum with 1.2 (Dhull *et al.*, 2020).

GM are the product of photosynthesis, followed by additional biosynthetic modifications in nature, and have great industrial relevance (Sharma *et al.*, 2022). The structural characteristics of these polysaccharides make them soluble in water at a wide range of temperatures, and chemically and biochemically reactive. Due to their large number of hydroxyl (-OH) groups and the absence of ionic charges in their structure, GM are susceptible to molecular changes (Geronço *et al.*, 2021).

GM derivatives, e.g. obtained by hydrolysis, sulfation, or phosphorylation, provide biological and technological functionalities that are of interest in food, biomedical and other industries (Table 1). This review aims to describe the synthesis and structural analysis of chemically modified GM to improve their physicochemical properties and expand their industrial application.

*Author for correspondence: Yolanda L. López-Franco
 e-mail: lopezf@ciad.mx

Received: October 31, 2022
 Accepted: February 13, 2023

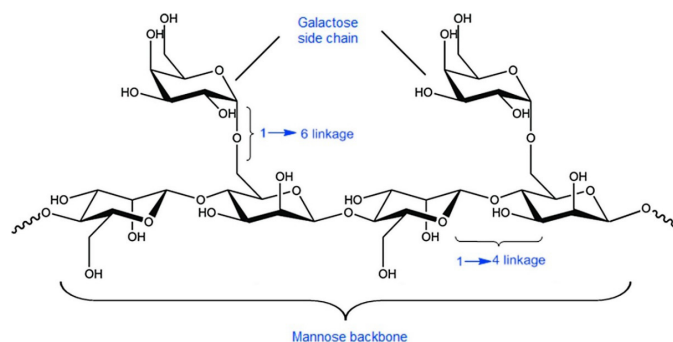


Figura 1. Representación esquemática de la estructura química de los galactomananos (George *et al.*, 2019).

Figure 1. Schematic representation of the chemical structure of galactomannans (George *et al.*, 2019).

Tabla 1. Estructura-función de derivados de galactomananos de diferentes fuentes.

Table 1. Structure-function of galactomannan derivatives from different sources.

Galactomannan source	Derivatized obtaining process	Functional properties	Reference
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Hydrolysis	Hepatoprotective	Wu <i>et al.</i> , 2019
<i>Cerantonía siliqua</i>	Hydrolysis	Immunomodulatory	Chen <i>et al.</i> , 2018
<i>Sesbania cannabina</i>	Hydrolysis	Antioxidant and immunomodulatory	Tao <i>et al.</i> , 2021
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Hydrolysis	Dietary fiber	Buriti <i>et al.</i> , 2014
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Sulfation	Antiviric	Lopes <i>et al.</i> , 2013
<i>Adenanthera pavonina</i> L., <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart., and <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tull	Sulfation	Antioxidant and antivirc	Mendes-Marques <i>et al.</i> , 2015
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Esterification	Emulsifier	Sarkar and Singhal, 2011
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Esterification	Emulsifier	Cerqueira <i>et al.</i> , 2019
<i>Sesbania cannabina</i>	Esterification	Film former	Liu <i>et al.</i> , 2021
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Carboxymetylation	Binder	Wang <i>et al.</i> , 2021
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Carboxymetylation	Thickener	Iqbal <i>et al.</i> , 2020
<i>Cassia obtusifolia</i>	Carboxymetylation	Gelling agent	Verma <i>et al.</i> , 2020
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Carboxymetylation	Gelling agent	Li <i>et al.</i> , 2021
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Etherification	Corrosion inhibitor	Biswas <i>et al.</i> , 2017
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Etherification	Corrosion inhibitor	Singh <i>et al.</i> , 2021
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Phosphorilation	Antioxidant	Wang <i>et al.</i> , 2014

STRUCTURE, PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS OF GALACTOMANNANS

GM is a nonionic polysaccharide conformed by a linear chain of β -(1 \rightarrow 4)-D-mannose with branches of α -(1 \rightarrow 6)-D-galactose, where the M/G ratio and molecular weight is closely related to its structure-function (Wielinga and Meyhall, 2009). Previously it was thought that these galactose units are linked at regular intervals, that is, alternate in each mannose of the main chain. However, subsequent enzymatic degradation analysis, NMR spectroscopy and computer simulation suggested the irregularity of side chains in such a way that the galactose units are arranged in the form of random doublets and triplets along the main chain (Mudgil *et al.*, 2014; Gupta and Variyar, 2018). Said random substitution of the galactose units leads to regions of high and low substitution in the mannan main chain (Figure 2). In galactose-

poor regions, non-covalent interactions between polymer chains could take place, while in galactose-rich regions, this high substitution prevents the formation of more organized structures due to steric hindrance of the side chains, which also results in a high solubility in aqueous solutions (Saurabh *et al.*, 2013).

The GM molecular weight one of the highest among natural polysaccharides, it could be up to 2×10^6 Da, measured by size exclusion chromatography with multiangle laser light scattering (López-Franco *et al.*, 2017; Gupta and Variyar, 2018). Due to the native characteristics of GM, it exhibits non-Newtonian behavior in solution and, like most polysaccharides with these characteristics, it has a pseudoplastic, or shear-thinning nature. This shear-thinning behavior of aqueous solutions increases with GM concentration and molecular weight. The apparent viscosity of these solutions demonstrates a decrease with an increasing shear rate. By

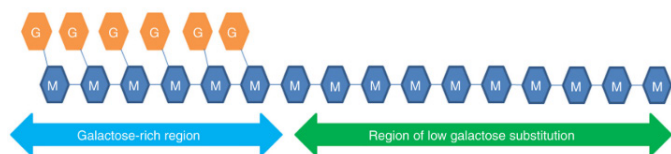


Figura 2. Representación esquemática de las regiones altamente sustituidas y poco sustituidas en galactosa (G) en la cadena principal de manosa (M) (Gupta y Variyar, 2018).

Figure 2. Schematic representation of galactose (G) highly substituted and low substituted regions in the mannose backbone (M) (Gupta y Variyar, 2018).

increasing the shear rate, disruption predominates over formation of new entanglements; molecules align in the direction of the flow and consequently a decrease in viscosity is observed (Hussain *et al.*, 2015). However, at very low and very high shear rates, GM solutions show Newtonian behavior (Whistler and Hymowitz, 1979).

Due to their hydrophilic character, GM have unique functional properties for various food uses. Among these are the water retention capacity, reduced evaporation rate, modification of the formation of ice crystals, regulation of rheological behavior and its emulsifying capacity (Gupta and Variyar, 2018). In this sense, the addition of GM in the preparation of white bread generally results in a greater absorption of water at the time of dough formation. Rodge *et al.* (2012) reported an 8 % increase in water absorption capacity with the addition of GM at 1 % in wheat flour; likewise, an increase in loaf volume of 30 % was observed compared to control. This behavior can be attributed mainly to the hydrophilic nature of the polysaccharide and its capacity to retain water during baking, in such a way that said moisture evaporates through an increase in vapor pressure, resulting in an improvement in bread volume.

On the other hand, the use of GM as an additive for ice cream has been a strategy to prevent the development of crystals and as a texturizing agent during freezing, however, the use of this polysaccharide is only suitable for short-duration ice cream at high temperature. This, mainly because it has a short hydration time, in addition, the GM is thermodynamically incompatible with milk proteins of the food system, given the phase separation between both biopolymers due to hydrophilicity differences of the protein and GM (Mudgil and Barak 2014). Therefore, to avoid phase separation in this type of product, GM is generally added together with other hydrocolloids, such as k-carrageenan (BahramParvar *et al.*, 2013; Javidi *et al.*, 2016). Also, GM have been used in the preparation of low-fat yogurt with a high content of dietary fiber. Lee and Chang (2016) reported a yogurt preparation with improved rheological characteristics by adding GM, which resulted in reduced syneresis and improved texture with acceptable sensory characteristics comparable to control products.

Additionally, GM are part of the most popular and widely used hydrocolloids in the formulation of ketchup-type sauces, to prevent syneresis during freezing and provide stability in heating by cooking. Torbica *et al.* (2016) have

previously reported the preparation of a ketchup-type sauce derived from tomato pomace, with acceptable sensory and textural qualities using GM and xanthan gum as thickeners, managing to reduce whey loss. Likewise, this hydrocolloid has been added in the formulation of mayonnaise and dressings, to reduce the dispersed phase (oil) and increase the water content in the emulsion to create low-fat products. However, due to its hydrophilic characteristics, the use of native GM is restricted the formulation of systems that contain water as a dispersant phase. The uses and potential applications of GM could expand with the knowledge of different synthetic routes of chemical modification applied to obtain changes on the structure-function relationship of polysaccharide.

CHEMICAL MODIFICATION OF GALACTOMANNANS

Hydrolyzed galactomannans

Hydrolysis, either by chemical methods or enzymatic reactions, is one of the most important and practical strategies for the modification of polysaccharides such as GM (Geronço *et al.*, 2021). In the enzymatic method, the galactose side chains or the mannose main chain, can be hydrolyzed by α -galactosidase and β -mannanase, respectively, it is simple to control, and the reaction conditions are mild compared to chemical hydrolysis which is non-specific and highly aggressive (Ba *et al.*, 2012). The GM functional properties are greatly influenced by their molecular weight, and based on this, the hydrolysis of the mannose main chain and galactose side chain results in a strategy for the modification of its viscoelastic properties (Zhou *et al.*, 2016).

For this purpose, hydrochloric, sulfuric, and trifluoroacetic acids are used, in addition to the application of heat to accelerate the hydrolysis reaction of the side chains by mild conditions (Biermann, 1989). However, this type of hydrolysis results in a difficult elimination of acidic remnants with the probable exception of trifluoroacetic acid, which can be removed by rotary evaporation due to its volatility at not very high temperatures (Liu *et al.*, 2020). Hence, research on obtainment and fractionation of GM hydrolysates has focused mainly on the use of enzymatic catalysis as a less complicated way to obtain mannoooligosaccharides.

Wu *et al.* (2019) evaluated the hepatoprotective effect of GM partially hydrolyzed with β -mannanase from *Rhizomucor miehei*. The composition of these hydrolysates was 24.9 % (w/w) of mannoooligosaccharides with a degree of polymerization of < 7. The average molecular weight of the hydrolyzed GM was 2.5×10^4 Da identified by gel permeation chromatography, the decrease of which was effective by enzymatic treatment. These hydrolyzed GM had a hepatoprotective effect in Kunming mice, by increasing the activity of the superoxide dismutase and glutathione peroxidase antioxidant enzymes. This event, in turn, decreased alcohol-induced lipid peroxidation, and thus the integrity and fluidity of cell membranes.

Similarly, Chen *et al.* (2018) hydrolyzed GM with 8 U/mL of a *Pichia pastoris* thermostable β -mannanase at different times of action on the substrate at 50 °C. Native GM had a

higher molecular weight than the hydrolyzed ones with a significant decrease from 5.58×10^6 to 3.18×10^3 Da, demonstrating the presence of manooligosaccharides after 24 h. These hydrolysates exhibited immunomodulatory activity by stimulating the production of TNF- α in RAW 264.7 cells, an important cytokine that intervenes in the inflammation and apoptosis processes.

Recently, hemicellulosic polysaccharides such as GM and their degradation products are gaining more attention due to their excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidant enhancement and immunomodulatory activities. Tao *et al.* (2021) hydrolyzed GM from β -endo-mannanase of *Trichoderma reesei* and evaluated its antioxidant and immunomodulatory effect. GM hydrolysates showed a strong protective effect against induced oxidative stress, using a model of RAW 264.7 cells injured with hydrogen peroxide, as indicated by superoxide dismutase activity and malondialdehyde content.

Structurally, manooligosaccharides continue to be only the repeating unit of GM in its native form, as its general composition and most of its physicochemical properties are not affected. For example, the FTIR spectrum is very similar to GM and their hydrolysates that show characteristic absorption bands of this polysaccharide as reported in the literature (Cerqueira *et al.*, 2011; Mudgil *et al.*, 2012). Furthermore, the partial hydrolysis of GM leads to a decrease in the polydispersity index by up to one-third, this is due to the general reduction of all molecular weight populations (Buriti *et al.*, 2014). Partially hydrolyzed GM, as it does not suffer significant alterations, seems to be a potential alternative, increasing the availability of new food ingredients, as a source of dietary fiber.

Sulfated galactomannans

A promising derivatized structure of GM is the synthesis of their compounds that contain a sulfonic group ($-\text{SO}_3\text{H}$) or their salt ($-\text{SO}_3\text{Na}$). The addition of this functional group in a biopolymer macromolecule changes its physicochemical characteristics, increasing its solubility in water and its biodegradability (Kazachenko *et al.*, 2020). The presence of the $-\text{SO}_3\text{H}$ group in the polysaccharide structure (Figure 3) provides important properties, since the sulfate group has a negative charge in a determined pH range to electrostatically bind to positively charged molecules. However, the synthesis of sulfated polysaccharides is a challenge due to the many stereocenters in their structure, the presence of similar functional groups, and the need to preserve the orientation of the glycosidic bonds. Therefore, from a chemical perspective, sulfated polymeric structures are synthesized by sulfating natural polysaccharides or polymeric analogs (Caputo *et al.*, 2019).

There are many challenges associated with polysaccharide sulfation, such as low -OH group reactivity, poor solubility in organic solvents, regioselectivity, degree of sulfation, and isolation of the derivatized polysaccharide. There are scarce solvents in which both the polysaccharide and the sulfated derivatized are soluble, and the reactions are not complete

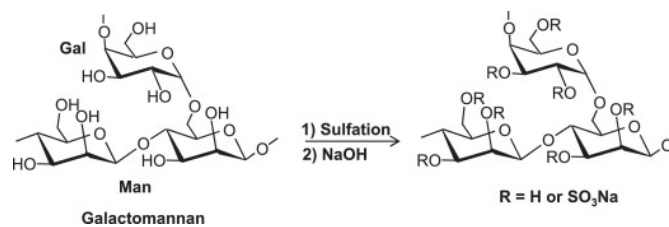


Figura 3. Esquema del proceso de sulfatación de galactomannanos (Muschin *et al.*, 2016)

Figure 3. Scheme of sulfation process of galactomannans (Muschin *et al.*, 2016).

(Richter and Klemm, 2003). On the other hand, identifying and targeting a specific sulfation site is complicated due to the many -OH groups in the polysaccharide. Thus, protecting groups are required which increases the complexity, and decreases yield. Furthermore, sulfating multiple -OH on a single monosaccharide unit is complicated due to electrostatic repulsion between neighboring $-\text{SO}_3\text{H}$ adding a grade of complexity to the derivatization (Al-Horani and Desai, 2010).

Given the structure-function relationship of polysaccharides, the degree of sulfation becomes an important parameter to control, when synthesizing sulfated GM (Caputo *et al.*, 2019). The chlorosulfonic acid and sulfuric acid are currently used in the sulfation process of GM as a sulfating reagent in presence of a strong base (pyridine or piperidine), and its subsequent isolation by converting it into sodium salt. In this sense, the use of chlorosulfonic acid is the most used route to obtain sulfated GM with different sulfation degrees. In contrast to these reagents, sulfamic acid is a stable non-hygroscopic crystalline substance with the reactivity like that of the $-\text{SO}_3$ tertiary amine complex that in the presence of urea, which plays a role of the main catalyst, its sulfation occurs (Kuznetsov *et al.*, 2018).

In this sense, Kazachenko *et al.* (2021) synthesized sulfated GM from sulfamic acid-urea complexes at different reaction times and temperatures. In this study they determined that at 80 °C and for 60 min, the highest possible degree of sulfation (1.67) is obtained by this synthetic route. Thus, from these milder conditions it is possible to have a more effective sulfation process from eco-friendly reagents than from the conventional chlorosulfonic acid route. Qin *et al.*, (2020) evaluated a response surface methodology (RSM) study for the optimization of the sulfation process by varying the chlorosulfonic acid / pyridine ratio, temperature, and reaction time. This study provided optimal sulfation conditions for GM with a 66 % degree of sulfation, which were an acid chlorosulfonic / pyridine ratio of 3:1, reaction time of 4 h and reaction temperature of 40 °C. Two characteristic absorption peaks appeared in FTIR spectra at 1250 cm^{-1} and 806 cm^{-1} , indicating sulfation of GM. The ^{13}C -CP/MAS NMR spectra confirmed that the substitution position was mainly at C6 in sulfated GM.

Previously, Wang *et al.* (2014) optimized the sulfation process by varying the same parameters by RSM. In this study, a mathematical model was constructed where the optimal reaction conditions of GM were a chlorosulfonic

acid / pyridine ratio of 1.27, reaction time of 120 min, and reaction temperature of 50.8 °C. Among the three reaction parameters studied, reaction time was the most significant factor to have an effect on the sulfation process, based on the slope gradient in the 3D response surface plots (Wang *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2020).

Lopes *et al.* (2013) sulfated GM with chlorosulfonic acid in pyridine/formamide to study the inhibition of herpes simplex virus (HSV-1) and poliovirus (PV-1). These authors reported an 8.7 % degree of sulfation obtained from three consecutive sulfation procedures. FTIR analysis demonstrated the presence of sulfated polysaccharides with a band at 1255 cm^{-1} which refers to the vibration of asymmetric stretching of the ester sulfate bond (S=O). These sulfated products inhibited HSV-1 and PV-1 with an IC_{50} of 405 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, interfering various stages of viral replication, adsorption, and penetration in both cases.

Similarly, Mendes-Marques *et al.* (2015) sulfated GM with the same method for the inhibition of dengue virus, in this case they reported a 33 - 39 % degree of sulfation and mentioned the importance of this parameter in its activity. Confirmation of the sulfation process was performed by FTIR spectroscopic analysis with the presence of a band at 1259 cm^{-1} corresponding to the stretching vibrations of the S=O group mentioned above. Likewise, these derivatized polysaccharides presented a positive correlation between the degree of sulfation and the antiviral activity against the dengue virus DENV-2 and its antioxidant capacity.

Galactomannan fatty acid esters

Chemical modification has conventionally been used as a strategy to change the hydrophilicity of polysaccharides, through the formation of esters. The esterification of GM is carried out regioselectively, this is that the primary alcohol will always be more nucleophilic than the secondary alcohol in the polysaccharide structure (Kanelli and Topakas, 2017). Their respective rate constants for the primary and secondary alcohols do not change during the esterification process, where primary alcohol reacts faster than secondary alcohol, decreasing its concentration as the reaction progresses. Therefore, eventually, the reaction rates will become similar and the regioselectivity will decrease (Fox *et al.*, 2011; Koschella *et al.*, 2006).

Esterification generally involves the reaction of an alcohol with an acylating agent, such as vinyl carboxylates, acyl chlorides, acid anhydrides, as well as the carboxylic acids themselves. On this basis, carboxylic acids have been obtained by Fischer esterification conventionally by strong acid catalysis (concentrated H_2SO_4), or by in situ activation of the carboxylic group under mild conditions for the acylation of polysaccharides (Cumpstey, 2011). Previously, different synthetic routes have been reported to obtain GM esters, through both chemical and enzymatic routes, either using strong acids or strong bases to react with the acyl donor or using enzymes such as lipase or transferases to catalyze the reaction.

Fujioka *et al.* (2009) synthesized GM esters through the esterification of the succinate group in the polymer chains. They reacted native GM with succinic anhydride, using DMSO as a solvent and 4-dimethylaminopyridine as a catalyst. FTIR spectroscopy was used to demonstrate the presence of the ester group, showing absent absorption bands at 1735 cm^{-1} and 1550 cm^{-1} in the spectrum of the native GM indicating the esterification of the polysaccharide with a degree of substitution of 0.6. In another study, Shenoy and Melo (2010) esterified hydroxypropyl GM using acetic anhydride as donor acyl and pyridine as a catalyst, to be used as filler in unsaturated polyester compounds. The esterification of this polysaccharide leads to an increase in the hydrophobic character of the resulting polymer where the variation of the reaction time results in the formation of esterified GM with degrees of substitution of 0.58, 1.1, 1.8, and 3.0. The FTIR of the products showed an increase in the intensity of the carbonyl band obtained in the region of 1735 - 1750 cm^{-1} derived from the increase in the degree of substitution of the polymer.

On the other hand, Iqbal *et al.* (2020a) reported GM esters of aliphatic carboxylic acids of medium and long chain (C5-C18) from acyl chlorides, examining their physical properties concerning the length of the fatty acid chain and degree of substitution. The FTIR spectrum showed typical bands of a structurally native GM for all samples, added to the bands at 1754 cm^{-1} and 723 cm^{-1} corresponding to the C=O bond of the ester group and the oscillating vibrations of the $-\text{CH}_2$ groups of the aliphatic chain, respectively. However, this type of reaction leads to polymer degradation and not very high degrees of substitution due to the use of aggressive catalysts with respect to pH.

An alternative to this process has been biocatalysts through the use of enzymes to modify the structure of polysaccharides, with the advantage that it is often chemo specific, which allows the synthesis of products with well-defined or stereo-specific structures (Cumpstey, 2011; Cheng and Gu, 2012). Some enzymes have a wide tolerance to the substrate and catalyze reactions in generic structures, hence, esterases, proteases, and lipase have been used to catalyze the formation of esters in polysaccharides, even being an unnatural function of the enzyme. This is because they do not differentiate the -OH groups, but the enzyme will tend to act on the -OH group (esterification) or ester (hydrolysis) that is more sterically accessible, that is, located in primary positions (Cumpstey, 2011). Enzymes normally require at least an amount of water to carry out their action correctly, being structurally unstable in non-aqueous media. However, water is not a good medium for ester synthesis, in these conditions is reversible. When the water is in excess, the chemical equilibrium of the reaction tends towards hydrolysis, so the degree of substitution of the products would be very low (Alissandratos *et al.*, 2010).

On the other hand, polar solvents such as DMSO and DMF can remove essential catalytic water from the surface of enzymes, inactivating them and thus have lower hydrogen bonding capacity leading to higher enzymatic activity (Gu

and Cheng, 2005). However, there are no well-established protocols for GM enzymatic esterification, unlike starch and cellulose, which are the most widely used for this chemical modification (Yang and Wang, 2003; Rajan *et al.*, 2008). Most studies are mainly focused on their interaction with hydrophobic compounds and not on the application of GM esters.

In that context, Sarkar and Singhal (2011) elaborated GM succinate and oleate as microencapsulation material in O/W emulsions. The addition of these aliphatic chains leads to an improvement in its emulsifying capacity with low droplet size and viscosity, which makes it an important material for the protection of different food components. In another study, Cerqueira *et al.* (2019) elaborated GM acetate nanomicelles as carrier material for hydrophobic compounds such as curcumin. These modifications to the GM led to an encapsulation efficiency greater than 99 % and a ζ potential of -18.1 mV, indicating an effective charge of curcumin and repulsion between the nanomicelles to prevent them from agglomerating.

In contrast, in the esterification of GM for the addition of aliphatic chains, hydrophobic films of GM acetate have also been developed as a barrier system and protection against water in food packaging (Liu *et al.*, 2021). In this work, the chemical modification provides a good hydrophobicity to the film with a contact angle of 107 ° and a decrease in its water vapor permeability properties. Thus, the synthesis of these amphiphilic compounds contributes to the development of new compounds for hydrophobic systems. In addition, it will be of vital importance when establishing the synthetic routes to produce GM esters and choose the appropriate compounds for the correct esterification of the polysaccharide.

OTHER DERIVATIZED GALACTOMANNANS

Carboxymethyl galactomannan

Carboxymethyl galactomannan (CMG) is an anionic GM derivative with a high dissolving rate of viscosity and good stability. Various synthetic routes have been developed to obtain CMG (Figure 4). This is produced by reacting monochloroacetic acid or its sodium salt with deprotonated GM. A strong base, such as sodium hydroxide, is needed to activate the -OH group of GM for nucleophilic substitution (Cumpstey, 2011). Previous studies related to CMG preparation used organic solvents such as acetone, ethanol, isopropanol, and butanol as the medium (Gao and Grady, 2018). GM has been previously dissolved in water, however, the use of excess water in a ratio of approximately 50:1 generally has poor compatibility, because water can hydrolyze the alkylating agent (Dodi *et al.*, 2011).

The synthesis of CMG is widely studied; Wang *et al.* (2021) obtained CMG as robust water-soluble binder for silicon anodes in lithium-ion batteries, and the ^1H NMR spectrum shows that carboxymethyl was attached to position C-6. Additionally, in the FTIR spectrum, two new bands appear at 1602 cm^{-1} and 1411 cm^{-1} corresponding to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the COO^- group

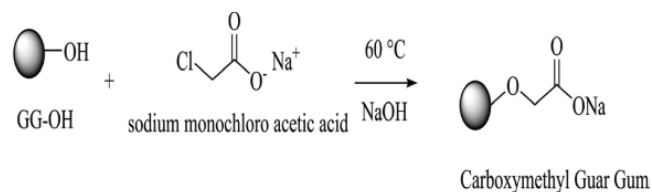


Figura 4. Síntesis de carboximetil galactomanano (CMG) de goma guar (Iqbal *et al.*, 2020)

Figure 4. Synthesis of carboxymethyl galactomannan (CMG) of guar gum (Iqbal *et al.*, 2020).

respectively, which further confirms the carboxymethylation of GM. In another study, Iqbal *et al.* (2020b) synthesized carboxymethylated GM derivatives and their structural characteristics as a synthetic thickener for textile prints. These had a degree of substitution of 0.35, and the FTIR spectrum demonstrates the substitution of carboxymethyl in GM with the bands corresponding to the COO^- vibrations that are symmetric or asymmetric at points 1429 cm^{-1} and 1615 cm^{-1} , respectively.

The potential applications for CMG can be diverse, for example, Verma *et al.* (2020) evaluated the CMG pharmaceutical applications by making ionotropically gelled beads using sodium diclofenac as a model drug, optimizing its design by RSM. The formulation used was 2.85 % (w/v) CMG and 15 % (w/v) CaCl_2 where the beads showed a loading efficiency of 95.41 % and a release of 93.32 % of diclofenac during 24 h. In another study, Li *et al.* (2021) fabricated polyelectrolytic gels of CMG and quaternary ammonium GM for the removal of dyes in water contaminated with Congo red and methylene blue as study models. These gels were pH and ion sensitive, with maximum adsorption capacities of 1441 and 94.52 mg/g of Congo red and methylene blue, respectively, mediated by electrostatic interactions.

Galactomannan alkyl ethers

Etherification of polysaccharides involves the reaction of the saccharide alcohol groups with an alkylating agent, these include alkyl halides (e.g. bromides, chlorides, and iodides), or less commonly, alkyl sulfonates. Typically, a strong base is used to deprotonate a saccharide alcohol to form an alkoxide ion that attacks the alkyl halide, through an $\text{S}_{\text{N}}2$ mechanism to form a polysaccharide alkyl ether. Usually, the alcohol from which the alkoxide is derived can be used as solvent, but it improves the reaction performance if we use aprotic solvents such as DMF or DMSO (Cumpstey, 2011). Currently, derivatized GM alkyl ethers have been reported, such as: methyl, butyl, benzyl, ethyl acrylate and 2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride (HPTAC) GM ethers (Kazachenko *et al.*, 2022a).

The synthesis of methyl and benzyl GM ether has been widely studied, for instance, Mohammed and Ragab (2021) synthesized these GM ethers in a DMSO/paraformaldehyde system using dimethyl sulfate and benzyl chloride as alkylating agents in presence of sodium hydroxide as a catalyst. The correct etherification of the polysaccharide was determi-

ned from FTIR shown new peaks at 1114 cm^{-1} and 1056 cm^{-1} indicating C-O stretching vibration of functional group of ether for methyl GM and benzyl GM respectively. In another study, Kazachenko *et al.* (2022b) synthesized GM butyl ether using bromobutane as an alkylating agent in the presence of sodium hydroxide as a catalyst. Etherification was confirmed by FTIR showing absorption bands at 1077, 879, 815 and 796 cm^{-1} , corresponding to the vibrations of the ether bond of the -C-O-C- groups.

The potential applications of GM alkyl ethers have not yet been as extensively studied. The etherification of HPTAC has been used as a strategy for obtaining cationic GM as a corrosion inhibitor (Biswas *et al.*, 2017). Similarly, Singh *et al.* (2021) synthesized galactomannan ethyl acrylate ether as a corrosion inhibitor on steel under acidic conditions. However, it is necessary to address the possible applications of all types of GM alkyl ethers including those synthesized from uncharged alkyl groups to obtain a more diverse picture in the use of this type of derivatized GM.

Phosphorylated galactomannan

The production of phosphorylated GM is carried out by different synthetic routes: phosphoric acid, phosphoric anhydride, phosphorous trichloride (Figure 5), or dimethyl phosphate (Suflet *et al.*, 2006). Furthermore, H_3PO_4 and H_3PO_3 have been usually used as phosphorylating reagents at higher temperatures, generally leading to a low degree of substitution (0.26, phosphate content 4.05 %) and polysaccharide degradation (Wang *et al.*, 2013). The applications for phosphorylated GM have not been so widely studied, being its antioxidant capacity and its relationship with DS one of the few reports found. In this sense, Wang *et al.* (2014) synthesized phosphorylated GM with POCl_3 to evaluate the effect of the degree of substitution with respect to its conformation in solution. The degree of substitution varied from 0.35 to 0.52, and the FTIR spectrum showed new peaks around 1250 cm^{-1} that describe an asymmetric P=O stretching vibration, a shoulder at 1050 cm^{-1} corresponding to the P-OH bond, which is attributed to the presence of phosphorylated GM. Finally, the antioxidant capacity was increased to a higher DS of 0.52, which indicates that this derivatized polysaccharide could be effective in scavenging radicals *in vitro*.

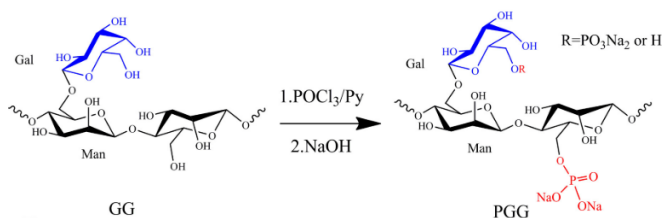


Figura 5. Ruta esquemática para obtener galactomananos fosforilados mediante POCl_3 (Wang *et al.*, 2014).

Figure 5. Schematic route for obtaining phosphorylated GM by POCl_3 (Wang *et al.*, 2014).

CONCLUSIONS

This review highlighted the different chemical modifications and structural characteristics of different derivatized products of GM. Naturally, polysaccharides like these already possess characteristic physicochemical properties such as solubility, swelling, and viscosity inherent in their origin, which are not always desirable for other types of unconventional applications. The chemical modification of GM, on the other hand, leads to structures with new characteristics that can compete with different synthetic excipients already available on the market. This in turn provides excipients that can be less toxic than various synthetic polymers. The future of formulations design using natural polymers and their different chemical modifications is in a strong position. Therefore, natural and derivatized polymers can compete if scientists continue to explore materials and modify them for various formulation designs.

REFERENCES

- Al-Horani, R. A. and Desai, U. R. 2010. Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges, *Tetrahedron*, 66(16), pp. 2907-2918. doi: 10.1016/j.tet.2010.02.015.
- Alissandratos, A., Baudendistel, N., Flitsch, S. L., Hauer, B. and Halling, P. J. 2010. Lipase-catalysed acylation of starch and determination of the degree of substitution by methanolysis and GC, *BMC Biotechnology*, 10, pp. 0-7. doi: 10.1186/1472-6750-10-82.
- Ba, J., Gao, Y., Xu, Q. H. and Qin, M. H. 2012. Research development of modification of galactomannan gums from plant resources, *Advanced Materials Research*, 1628-1631. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.482-484.1628.
- BahramParvar, M., Tehrani, M. M. and Razavi, S. M. A. 2013. Effects of a novel stabilizer blend and presence of κ -carrageenan on some properties of vanilla ice cream during storage, *Food Bioscience*, 3, pp. 10-18. doi: 10.1016/j.fbio.2013.05.001.
- Biermann, C. J. 1989. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. C.J Biermann and G.D McGinnis (ed.) pp. 27-42. CRC Press, Boca Raton.
- Biswas, A., Pal, S. and Udayabhanu, G. 2017. Effect of chemical modification of a natural polysaccharide on its inhibitory action on mild steel in 15% HCl solution, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 31(22), pp. 2468-2489. Doi: 10.1080/01694243.2017.1306912.
- Buriti, F. C., dos Santos, K. M., Sombra, V. G., Maciel, J. S., Teixeira Sá, D. M., Salles, H. O., Oliveira, G., de Paula, R. C., Feitosa, J. P., Monteiro Moreira, A. C., Moreira, R. A. and Egito, A. S. 2014. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre, *Food Hydrocolloids*, 35, pp. 512-521. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.015.
- Caputo, H. E., Straub, J. E. and Grinstaff, M. W. 2019. Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides, *Chemical Society Reviews*, 48(8), pp. 2338-2365. doi: 10.1039/c7cs00593h.
- Carter-Fox S., Li B., Xu D., and Edgar K. J. 2011. Regioselective esterification and etherification of cellulose: A review, *Biomacromolecules*, 12(6), pp. 1956-1972. doi: 10.1021/bm200260d.

- Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Simões, J., Teixeira, J. A., Domingues, M. R. M., Coimbra, M. A. and Vicente, A. A. 2011. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources, *Carbohydrate Polymers*, 83(1), pp. 179-185. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.07.036.
- Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Pastrana, L. M. and Vicente, A. A. 2019. Amphiphilic modified galactomannan as a novel potential carrier for hydrophobic compounds, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, pp. 1-8. doi: 10.3389/fsufs.2019.00017.
- Chen, W., Chen, H., Guo, G., Huang, Y., Chen, C., Tsai, Y., Huang, K. and Yang, C. 2018. Locust bean gum galactomannan hydrolyzed by thermostable β -D-mannanase may reduce the secretion of pro-inflammatory factors and the release of granule constituents, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, pp. 181-186. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.097.
- Cheng, H. N. and Gu, Q. M. 2012. Enzyme-catalyzed modifications of polysaccharides and poly(ethylene glycol), *Polymers*, 4(2), pp. 1311-1330. doi: 10.3390/polym4021311.
- Cumpstey, I. 2011. *Chemical Modification of Polysaccharides*, ISBN Organic Chemistry, 2013, pp. 383-406.
- Dhull, S. B., Sandhu, K. S., Punia, S., Kaur, M., Chawla, P. and Malik, A. 2020. Functional, thermal and rheological behavior of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) gums from different cultivars: A comparative study, *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, pp. 406-414. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.094.
- Dodi C. and Popa, M. I. 2011. Carboxymethylation of guar gum: Synthesis and characterization, *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(3-4), pp. 171-176.
- Fidan, H., Stankov, S., Petkova, N., Petkova, Z., Iliev, A., Stoyanova, M., Ivanova, T., Zhelyazkov, N., Ibrahim, S., Stoyanova, A. and Ercisli, S. 2020. Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds, *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), pp. 2404-2413. doi: 10.1007/s13197-020-04274-z.
- Gao, J. and Grady, B. P. 2018. Reaction kinetics and subsequent rheology of carboxymethyl guar gum produced from guar splits, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 57(22), pp. 7345-7354. doi: 10.1021/acs.iecr.8b00782.
- George, A., Shah, P. A. and Shrivastav, P. S. 2019. Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications, *European Polymer Journal*, 112, pp. 722-735. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.10.042.
- Geronço, M. S., da Silveira Ramos, I. F., da Silva Filho, E. C., dos Santos Rizzo, M., Ribeiro, A. B. and da Costa, M. P. 2021. Are Structurally Modified Galactomannan Derivatives Biologically Active?, *Polysaccharides*, 2(1), pp. 1-15. doi: 10.3390/polysaccharides2010001.
- Gu, Q. M. and Cheng, H. N. 2005. Enzyme-Catalyzed Condensation Reactions for Polymer Modifications, (1), pp. 427-436. doi: 10.1021/bk-2005-0900.ch030.
- Gupta, S. and Variyar, P. S. 2018. *Guar Gum: A Versatile Polymer for the Food Industry*, *Biopolymers for Food Design*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811449-0.00012-8.
- Hussain, M., Bakalis, S., Gouseti, O., Zahoor, T., Anjum, F. M. and Shahid, M. 2015. Dynamic and shear stress rheological properties of guar galactomannans and its hydrolyzed derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp. 687-691. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.09.019.
- Iqbal, D. N., Hussain, E. A., Ghani, A., Hassan, F., Bukhari, A., Iftikhar, S., Nazir, A., Ahmad, A. and Iqbal, M. 2020a. Green and environmentally friendly techniques for enhanced physicochemical characteristics attributed to polysaccharides for industrial applications, *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(5), pp. 3457-3466. doi: 10.15244/pjoes/111511.
- Iqbal, D. N., Nazir, A., Iqbal, M., and Yameen, M. 2020b. Green synthesis and characterization of carboxymethyl guar gum: Application in Textile Printing Technology, *Green Processing and Synthesis*, 9(1), pp. 212-218. doi: 10.1515/gps-2020-0022.
- Javidi, F., Razavi, S. M., Behrouzian, F. and Alghooneh, A. 2016. The influence of basil seed gum, guar gum and their blend on the rheological, physical and sensory properties of low-fat ice cream, *Food Hydrocolloids*, 52, pp. 625-633. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.08.006.
- Kanelli, M. and Topakas, E. 2017. Acylation of soluble polysaccharides in a biphasic system catalyzed by a CE2 acetyl esterase, *Carbohydrate Polymers*, 163, pp. 208-215. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.057.
- Kazachenko A. S., Malyar, Y. U. N., Vasilyeva, N. Y. U., Bondarenko, G. N., Korolkova, I. V., Antonov, A. V., Karacharov, A. A., Fetisova, O. Y. U., and Skvortsova, G. P., 2020. Green synthesis and characterization of galactomannan sulfates obtained using sulfamic acid. *Biomass Conversion and Biorefinery*, pp 1-10, doi: 10.1007/s13399-020-00855-2.
- Kazachenko, A. S., Malyar, Y. N., Vasilyeva, N. Y., Borovkova, V. S., and Issaoui, N. 2021. Optimization of guar gum galactomannan sulfation process with sulfamic acid, *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi: 10.1007/s13399-021-01895-y.
- Kazachenko, A. S., Malyar, Y. N., Ghatfaoui, S., Issaoui, N., Al-Dossary, O., Wojcik, M. J., and Berezhnaya, Y. D. 2022a. A density functional theory calculations of infrared spectra of galactomannan butyl ether, *Journal of Molecular Structure*, 1251, p. 131998. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131998.
- Kazachenko, A. S., Fetisova, O. Y., Antonov, A. V., Bondarenko, G. N., and Sychev, V. V. 2022b. Production and description the characterization of guar gum galactomannan butyl ether, *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53(1), pp. 198-206. doi: 10.36103/ijas.v53i1.1525.
- Koschella, A., Fenn D., Illy N., and Heinze T. 2006. Regioselectively functionalized cellulose derivatives: A mini review, *Macromolecular Symposia*, 244, pp. 59-73. doi: 10.1002/masy.200651205.
- Kuznetsov, B. N., Levdansky, V. A., Kuznetsova, S. A., Garyntseva, N. V., Sudakova, I. G., and Levdansky, A. V., 2018. Integration of peroxide delignification and sulfamic acid sulfation methods for obtaining cellulose sulfates from aspen wood. *European Journal of Wood and Wood Products* 76(3): 999-1007. doi: 10.1007/s00107-017-1262-z.
- Li, P., Wang, T., He, J., Jiang, J. and Lei, F. 2021. Synthesis, characterization, and selective dye adsorption by pH- and ion-sensitive polyelectrolyte galactomannan-based hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, 264, p. 118009. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118009.
- Liu, W., Gu, J., Huang, C., Lai, C., Ling, Z. and Yong, Q. 2021. Fabrication of hydrophobic and high-strength packaging films based on the esterification modification

- of galactomannan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, pp. 1221-1229. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.076.
- Liu, Y., Lei, F., He, L., Xu, W. and Jiang, J. 2020. Comparative study on the monosaccharides of three typical galactomannans hydrolyzed by different methods, *Industrial Crops and Products*, 157, p. 112895. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112895.
- Lopes, N., Faccin-Galhardi, L. C., Espada, S. F., Pacheco, A. C., Ricardo, N. M. P. S., Linhares, R. E. C. and Nozawa, C. 2013. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus, *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, pp. 93-99. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.015.
- López-Franco, Y., Cervantes-Montaño, C., Martínez-Robinson, K., Lizardi-Mendoza, J. and Robles-Ozuna, L. 2013. Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis* spp.), *Food hydrocolloids*, 30(2), pp. 656-660. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.08.012.
- López-Franco, Y. L., Toledo-Guillén, A. R., and Lizardi-Mendoza, J. 2017. Biopolymers from mesquite tree (*Prosopis* spp). In: *Advances in Physicochemical Properties of Biopolymers (Part 1)*. M. Masuelli and D. Renard (eds.), pp 273-294. <https://doi.org/10.2174/9781681084534117010012>.
- Mendes-Marques, M. M., Maia-de Morais, S., Araújo-da Silva, A. R., Dutra-Boroso, N., Pontes-Filho, T. R., de Carvalho-Araújo, F. M., Pinto-Vieira, I. G., Malta-Lima, D., and Florindo-Guedes, M. 2015. Antiviral and Antioxidant Activities of Sulfated Galactomannans from Plants of Caatinga Biome, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, pp 1-8. doi: 10.1155/2015/591214.
- Mohammed, S. E. and Ragab, Y. A. 2021. Preparation of Methyl and Benzyl Guar using Dimethyl Sulfoxide/Paraformaldehyde Solvent System, *Al-Butana Journal of Applied Science*, (12), pp. 12-28.
- Mudgil, D., Barak, S. and Khatkar, B. S. 2012. X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), pp. 1035-1039. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.02.031.
- Mudgil, D., Barak, S. and Khatkar, B. S. 2014. Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review, *Journal of Food Science and Technology*, 51(3), pp. 409-418. doi: 10.1007/s13197-011-0522-x.
- Muschin, T., Budragchaa, D., Kanamoto, T., Nakashima, H., Ichiyama, K., Yamamoto, N., Shuqin, H. and Yoshida, T. 2016. Chemically sulfated natural galactomannans with specific antiviral and anticoagulant activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp. 415-420. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.005.
- Pauly, M. and Keegstra, K. 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels, *Plant Journal*, 54(4), pp. 559-568. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x.
- Qin, X., Li, R., Zhu, S., Hu, J., Zeng, X., Zhang, X., Xu, H., Kong, W., Liang, J., Zhang, H., Zhang, J. and Wang, J. 2020. A comparative study of sulfated tara gum: RSM optimization and structural characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, pp. 189-199. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.031.
- Rajan, A., Sudha, J. D. and Abraham, T. E. 2008. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase, *Industrial Crops and Products*, 27(1), pp. 50-59. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.07.003.
- Richter, A. and Klemm, D. 2003. Regioselective sulfation of trimethylsilyl cellulose using different SO₃-complexes, *Cellulose*, 10(2), pp. 133-138. doi: 10.1023/A:1024025127408.
- Rodge, A. B., Sonkamble, S. M., Salve, R. V. and Hashmi, S. I. 2012. Effect of hydrocolloid (guar gum) incorporation on the quality characteristics of bread, *Journal of Food Processing and Technology*, 3(2), pp. 136. doi: 10.4172/2157-7110.1000136
- Sarkar, S. and Singhal, R. S. 2011. Esterification of guar gum hydrolysate and gum Arabic with n-octenyl succinic anhydride and oleic acid and its evaluation as wall material in microencapsulation, *Carbohydrate Polymers*, 86(4), pp. 1723-1731. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.07.003.
- Saurabh, C. K., Gupta, S., Bahadur, J., Mazumder, S., Variyar, P. S. and Sharma, A. 2013. Radiation dose dependent change in physicochemical, mechanical and barrier properties of guar gum based films, *Carbohydrate Polymers*, 98(2), pp. 1610-1617. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.07.041.
- Sharma, P., Sharma, S., Ramakrishna, G., Srivastava, H., and Gaikwad, K. 2022. A comprehensive review on leguminous galactomannans: structural analysis, functional properties, biosynthesis process and industrial applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), pp. 443-465. doi: 10.1080/10408398.2020.1819196.
- Shenoy, M.A. and D'Melo, D.J. 2010. Evaluation of properties of unsaturated polyester/acetylated hydroxypropyl guar gum composites, *Journal of Applied Polymer Science*, 17, 3204-3210. doi: 10.1002/app.32192.
- Singh, A., Ansari, K. R., Quraishi, M. A., Kaya, S., and Erkan, S. 2021. Chemically modified guar gum and ethyl acrylate composite as a new corrosion inhibitor for reduction in hydrogen evolution and tubular steel corrosion protection in acidic environment, *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(14), pp. 9452-9465. doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.12.103.
- Suflet, D. M., Chitanu, G. C. and Popa, V. I. 2006. Phosphorylation of polysaccharides: New results on synthesis and characterisation of phosphorylated cellulose, *Reactive and Functional Polymers*, 66(11), pp. 1240-1249. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2006.03.006.
- Tao, Y., Wang, T., Lai, C., Ling, Z., Zhou, Y. and Yong, Q. 2021. The in vitro and in vivo Antioxidant and immunomodulatory activity of incomplete degradation products of hemicellulosic polysaccharide (Galactomannan) from *Sesbania cannabina*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9:679558. doi: 10.3389/fbioe.2021.679558.
- Torbica, A., Belović, M., Mastilović, J., Kevrešan, Ž., Pestorić, M., Škrobot, D. and Dapčević Hadnađev, T. 2016. Nutritional, rheological, and sensory evaluation of tomato ketchup with increased content of natural fibres made from fresh tomato pomace, *Food and Bioproducts Processing*, 98, pp. 299-309. doi: 10.1016/j.fbp.2016.02.007.
- Verma, S., Rimpay and Ahuja, M. 2020. Carboxymethyl modification of *Cassia obtusifolia* galactomannan and its evaluation as sustained release carrier, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, pp. 3823-3834. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.231.
- Wang, J., Yang, T., Tian, J., Liu, W., Jing, F., Yao, J., Zhang, J. and Lei, Z. 2014. Optimization of reaction conditions by RSM

- and structure characterization of sulfated locust bean gum, *Carbohydrate Polymers*, 114, pp. 375-383. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.035.
- Wang, J., Yang, T., Tian, J., Zeng, T., Wang, X., Yao, J., Zhang, J. and Lei, Z. 2014. Synthesis and characterization of phosphorylated galactomannan: The effect of DS on solution conformation and antioxidant activities, *Carbohydrate Polymers*, 113, pp. 325-335. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.028.
- Wang, X., Zhang, Z., Yao, Q., Zhao, M. and Qi, H. 2013. Phosphorylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity, *Carbohydrate Polymers*, 96(2), pp. 371-375. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.029.
- Wang, Z., Huang, T. and Yu, A. 2021. A carboxymethyl vegetable gum as a robust water -soluble binder for silicon anodes in lithium-ion batteries, *Journal of Power Sources*, 489, p. 229530. doi: 10.1016/j.jpowsour.2021.229530.
- Whistler, R.L., Hymowitz, T., 1979. *Guar: Agronomy, Production, Industrial Use, and Nutrition*. Purdue University Press, West Lafayette. pp.ix + 124 pp. eBook ISBN: 9780911198515.
- Wielinga, W. C. and Meyhall, A. G. 2009. Galactomannans. In: *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, G. Phillips and P. Williams (eds.). pp. 228-251. eBook ISBN: 9781845695873; Hardcover ISBN: 9781845694142.
- Wu, C., Liu, J., Tang, Y., Li, Y., Yan, Q. and Jiang, Z. 2019. Hepatoprotective potential of partially hydrolyzed guar gum against acute alcohol-induced liver injury in vitro and vivo, *Nutrients*, 11(5), pp. 1-17. doi: 10.3390/nu11050963.
- Wu, Y., Ding, W., Jia, L. and He, Q. 2015. The rheological properties of tara gum (*Caesalpinia spinosa*), *Food Chemistry*, 168, pp. 366-371. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.083.
- Yang, K. and Wang, Y. J. 2003. Lipase-Catalyzed Cellulose Acetylation in Aqueous and Organic Media, *Biotechnology Progress*, 19(6), pp. 1664-1671. doi: 10.1021/bp0341388.
- Yang, Z., Peng, H., Wang, W., and Liu, T. 2010. Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites, *Journal of Applied Polymer Science*, 116(5), pp. 2658-2667. doi: 10.1002/app.
- Zhou, Z., Zhang, W., Duan, J., Zhang, W., Sun, D. and Jiang, J. 2016. Enhancement of *Gleditsia sinensis* gum rheological properties with pressure cell treatment in semi-solid state, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, pp. 254-260. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.061.



Effect of ion and protein concentration of Ps19, a shell protein from *Pteria sterna*, on calcium carbonate polymorph

Efecto de iones y concentración de proteína Ps19, una proteína de la concha de *Pteria sterna*, en los polimorfos de carbonato de calcio

Raquel Gabriela Arroyo-Loranca¹, Crisalejandra Rivera-Perez², Luis Hernandez-Adame², Ariel Arturo Cruz Villacorta¹, Jose Luis Rodriguez-Lopez³, Norma Yolanda Hernandez-Saavedra^{1*}

¹ Molecular Genetics Laboratory, Center for Biological Research of the Northwest (CIBNOR), La Paz, Baja California South, Mexico.

² CONACYT. Biological Research Center of the Northwest (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, Mexico.

³ Advanced Materials Department, Potosi Institute for Scientific and Technological Research, San Luis Potosi, Mexico.

ABSTRACT

Calcium carbonate is present in many biological structures such as bivalve shells, which is composed mainly of two CaCO₃ polymorphs: calcite and aragonite. However, other forms of calcium carbonate exist like vaterite and amorphous calcium carbonate (ACC) that are not commonly reported. Polymorph selection is influenced by salt concentration, co-factor ions, and the presence of shell matrix proteins (SMPs) which regulates calcium carbonate deposition, among other factors. In this study, *in vitro* calcium carbonate crystallization of four different saline solutions (1: 40 mM CaCl₂, MgCl₂, 100 mM NaHCO₃; 2: CaCl₂, 100 mM Na₂CO₃; 3: 40 mM CaCl₂, MgSO₄, 100 mM Na₂CO₃; 4: CaCl₂/MgCl₂, 100 mM NaHCO₃) at two molarities (40 o 100 mM) was evaluated with increased concentrations of the Ps19 protein (0.2, 0.7 y 1.2 µg/µL), an insoluble extracted protein from the *Pteria sterna* shell, previously described as a promotor of aragonite platelet crystallization. *In vitro* crystallizations showed that Ps19 is capable to induce aragonite and calcite deposition in a dose-dependent manner, but also vaterite under certain conditions, acting as a promotor and inhibitor of crystallization. The results contribute to understand how Ps19 control precipitation of calcium polymorphs in the growth of the prismatic and nacre layer of the shell of *P. sterna*.

Keywords: Mollusk, shell protein, calcium carbonate, crystallization, nacre.

RESUMEN

El carbonato de calcio está presente en muchas estructuras biológicas, como la concha de bivalvo, que se compone principalmente de dos polimorfos de CaCO₃: calcita y aragonito. Sin embargo, existen otras formas de carbonato de calcio como vaterita y carbonato de calcio amorfo (ACC) que no se reportan comúnmente. La selección de polimorfos está influenciada por la concentración de sal, los iones cofactores y la presencia de proteínas de la matriz de la cubierta (SMP) que regulan la deposición de carbonato de calcio, entre otros factores. En este estudio, se evaluó la cristalización *in vitro* de carbonato de calcio de cuatro soluciones salinas diferentes

(1: 40 mM CaCl₂, MgCl₂, 100 mM NaHCO₃; 2: CaCl₂, 100 mM Na₂CO₃; 3: 40 mM CaCl₂, MgSO₄, 100 mM Na₂CO₃; 4: CaCl₂/MgCl₂, 100 mM NaHCO₃) en dos molaridades (40 o 100 mM) con diferentes concentraciones de la proteína Ps19 (0.2, 0.7 y 1.2 µg/µL) una proteína insoluble extraída de la concha de *Pteria sterna*, descrita anteriormente como promotora de la cristalización de plaquetas de aragonita. Las cristalizaciones *in vitro* mostraron que Ps19 es capaz de inducir la deposición de aragonita y calcita de forma dependiente de la dosis, pero también de vaterita en determinadas condiciones, actuando como promotor e inhibidor de la cristalización. Los resultados contribuyen a comprender cómo Ps19 controla la precipitación de polimorfos de calcio en el crecimiento de la capa prismática y de nácar de la concha de *P. sterna*.

Palabras clave: Molusco, proteína de la concha, carbonato, cristalización, nácar.

INTRODUCTION

In nature, three different anhydrous crystalline polymorphs of calcium carbonate (CaCO₃) exist (calcite, aragonite, and vaterite), two well-defined hydrous crystalline polymorphs (calcium carbonate monohydrate and calcium carbonate hexahydrate), and one amorphous form (ACC) (Meldrum and Colfen, 2008). The biological process by which CaCO₃ polymorphs are synthesized is called biomineralization (Kocot *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2019). The shell of mollusks is the most studied CaCO₃ biomineral, because is the most abundant biomineral in nature and it is relatively easy to obtain (Demichelis *et al.*, 2018). The shell of bivalves is mainly composed of CaCO₃ (95 - 99 %) and an organic matrix containing acidic proteins, β-chitin, glycoproteins among other molecules (1 - 5 %) that function as a scaffold for mineral nucleation and plate formation (Wolf *et al.*, 2013).

The periostracum, the outer layer of the shell, is the first defense of the organism against external agents, it is not calcified and it is made of organic compounds (Kocot *et al.*, 2016). After the periostracum, the prismatic layer is composed mainly of calcite, the most stable and the second most abundant CaCO₃ polymorph in mollusks; it crystallizes in a

rhombohedral system making it a resistant and tough material to penetrate by forming prismatic structures (Bahn *et al.*, 2017). Beneath prismatic layer is the mother of pearl (nacre) layer, which is formed by aragonite. This polymorph has an orthorhombic form and it is less stable than calcite in isolated conditions, however, in the shell becomes a tougher, stiffer, and stronger material by assembling aragonite plates into structures that resemble a “brick-wall” (Evans, 2019). Besides calcite and aragonite, mollusks are capable to manipulate vaterite, the most unstable CaCO_3 polymorph present in the shell when their shell suffers a deformation (Wilt, 2005).

Vesicles of the mantle in mollusks act as ion storage sites of vaterite or amorphous calcium carbonate (ACC) (Addadi *et al.*, 2006). ACC is the hydrated form of CaCO_3 with a poorly order that contains magnesium (Addadi *et al.*, 2003), and acts a transient precursor of more stable CaCO_3 polymorphs (Politi *et al.*, 2008). There are two models that try to explain CaCO_3 nucleation. The first model, initiates with prenucleation, in which the ionic solution creates metastable clusters to begin the nucleation phase were single ions attach to the cluster and finally, depending on thermodynamic factors, calcite, vaterite, aragonite or ACC will be formed in the postnucleation phase. In second model, the prenucleation phase is pH-dependent to form a stable cluster, where the nucleation phase will begin depending on cluster concentration, its aggregation, or ion attachment. During the postnucleation phase, ACC is formed, and then calcite, aragonite, and vaterite are crystallized (Demichelis *et al.*, 2018).

Shell growth in mollusk is mediated by the shell matrix proteins (SMPs) from the mollusk shells. SMPs are synthesized in the mantle cells and released to the extrapallial fluid (EPF), between the mantle and the inner face of the shell (Wilt, 2005). The EPF contains a variety of ions which interact with SMPs (Wilt, 2005). SMPs are classified as soluble and insoluble proteins according to their solubility after the decalcification procedure used to extract them from the shell. Soluble proteins are rich in acidic hydrophilic residues, they are found between the crystals forming part of the scaffolding where CaCO_3 deposits (Levi-Kalisman *et al.*, 2001), while insoluble proteins are found inside the crystals, they have a high proportion of aliphatic amino acids forming short repetitive domains that have been associated with nucleation by promoting the interaction with acidic polyanionic soluble proteins (Wolf *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2018).

Crystal polymorph growth in the mollusk shell is modulated by SMPs protein concentration and by the presence of cofactors. Low protein concentration (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of some SMPs (e.g. Pfn44), have been related to calcite growth with few aragonite crystals formation, but the increase in protein concentrations (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) have shown a total inhibition of aragonite deposition (Pan *et al.*, 2014). However, other SMPs such as Pif97 and pearlín showed inhibition of calcite crystal growth and ACC stabilization *in vitro* in increasing amounts of proteins (Montagnani *et al.*, 2011; Bahn *et al.*, 2015). This significant discrepancy between proteins could be related to their function in shell formation, either as a modulator of

calcite or aragonite, or both. Besides protein concentration, Mg^{2+} ions have been reported to modulate aragonite growth (Pan *et al.*, 2014; Ma and Feng, 2015). Low magnesium content induces calcite growth while high magnesium content induces the formation of aragonite (Raz *et al.*, 2000). In *Hyriopsis cumingii*, the water-soluble matrix of aragonite pearls formed little needle-like crystals, accompanied by irregular Mg -calcite structures when low magnesium is present (10 mM). However, in the presence of high magnesium ions (40 mM), quasi-spherical aragonite aggregates appear from needle-like crystals, coexisting with a few Mg -calcites (Ma and Feng, 2015).

Other proteins, such as SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), from *P. fucata*, participate in nacre formation by stabilizing vaterite to inhibit calcite, as well as by forming aragonite in presence of Mg^{2+} or other proteins (Xie *et al.*, 2016). Nevertheless, there are also proteins able to produce aragonite crystals in presence of magnesium or calcium (40 mM) as cofactors, such as the glycoprotein Ps19 from *Pteria sterna* (Arroyo-Loranca *et al.*, 2020). Even when this information suggests that SMPs can to modulate crystal polymorphs by protein and ion concentrations, further research is needed to support this statement since the crystallization assay previously reported in several SMPs are not always comparable due to the different preparations used.

To understand the biomineralization processes is necessary to know the mechanism used by SMPs to control crystal deposition, either by protein and/or ion concentration. Therefore, this research aimed to understand the role of Ps19, a novel SMPs, with no homology to previously described proteins, on crystal deposition, by evaluating the effect of protein concentration (0.2 – 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and cofactor concentration (40/100 mM of MgCl_2 , CaCl_2 , 1:1 MgCl_2 : CaCl_2 and MgSO_4) on crystal polymorph deposition *in vitro*. The results indicate Ps19 is an effective promoter of aragonite and calcite in the presence of MgCl_2 and CaCl_2 , respectively. Also, this positive modulation is dependent on protein and ion concentration. Thus, this suggests that Ps19 may be involved in the prismatic and nacre layer of *Pteria sterna*.

MATERIAL AND METHODS

Ps19 extraction from *P. sterna* shell

Perlas del Cortez S. de R.L. MI., granted three adult organisms from Bahia de La Paz, B.C.S. Oysters were transported to the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. facilities where shells were pulverized, and 20 g of the powder were decalcified with cold acetic acid (10 % v/v) at 4 °C and constant stirring according to Montagnani *et al.* (2011); later, the solution was centrifuged to obtain the Acetic Soluble Matrix (ASM) and the Acetic Insoluble Matrix (AIM) as described by Arroyo-Loranca *et al.* (2020).

SDS-PAGE

The AIM, and later the Ps19 protein were loaded into a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970), the samples were trea-

ted as previously described by Arroyo-Loranca *et al.* (2020). A quantity of 60.3 µg of AIM and 15.1 µg of *P. sterna* shell Ps19 per gel were loaded. An SDS-PAGE molecular weight marker was used for molecular weight comparison (Broad range, Bio-Rad 161-0317). Electrophoresis was conducted at 90-V at room temperature, using a Bio-Rad electrophoresis unit (Protean II). After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) for 2 h, washed out, and analyzed using a Chemi Doc XRS (Bio-Rad).

Protein quantification by densitometry

Ps19 quantification was performed by pixel densitometry in a 16 % SDS-PAGE gel stained with CBB. A protein standard curve was constructed with ovalbumin protein (0.25 - 8.0 µg·µL⁻¹) as described by Arroyo-Loranca *et al.* (2020). A Chemi Doc XRS (Bio-Rad, California, USA) was used to analyze the image of the gel to obtain the linear equation (1) and calculate the quantity of the proteins present in the samples.

$$y = 5.31 \times 10^{-6}x - 0.94 \quad (1)$$

The Ps19 protein was purified from the AIM of *P. sterna* shell by four preparative polyacrylamide gel electrophoresis according to the Mini-Prep Cell manual (Bio-Rad, 491 Prep Cell) according to Arroyo-Loranca *et al.* (2020). A total of 100 fractions of 200 µL each were collected, selected fractions were loaded into an SDS-PAGE polyacrylamide gel (16 %) to identify the fractions containing the Ps19 protein. Then, fractions containing Ps19 were pooled, concentrated, and cleaned from the electrophoresis buffer by centrifugation with an Amicon Ultra-4 filter (EMD Millipore) as described by Arroyo-Loranca *et al.* (2020). The purified protein (380 µL) was stored at -20 °C.

Ps19 identification

The purified Ps19 was analyzed to verify the properties of the previously characterized protein by Arroyo-Loranca *et al.*

(2020). The molecular weight of Ps19 was calculated through its Rf, the calcium-binding capability was corroborated by the Stains-All stain (Green *et al.*, 1973) after electrophoresis separation as previously described. A total of 15.1 µg of Ps19 in an SDS-PAGE 16 % polyacrylamide gel was used.

Calcium carbonate crystallization *in vitro*

Calcium carbonate (CaCO₃) crystallization in the presence of Ps19 was evaluated by the incubation of four saturated solutions and three different protein concentrations that shown in Table 1. Each combination (10 µL of Ps19 and 50 µL of saturated solution) was placed over a glass coverslip inside a Petri dish with absorbent paper at the bottom to prevent condensation. The Petri dishes were sealed with parafilm, placed into a container, and incubated for 30 days at 4 °C. Controls and solutions 1 to 4 (50 µL) were mixed with sterile distilled water (10 µL) instead of Ps19 and the protein by itself (10 µL) was mixed with 50 µL of sterile distilled water. The morphology of the crystals was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) at the Electronic Microscopy Laboratory at Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), México. Every experiment and analysis were performed by triplicate.

Raman spectroscopy

Raman spectra were identified by using an InVia micro-Raman spectrometer (Renishaw, Gloucestershire, UK) with an excitation line of 532 nm provided by a YAG laser of 100 mW and a spot size of 2 µm x 2 µm. For measurements, the slits were set at 200 µm and a 100× objective was used. The crystals were scanned by triplicate for 90 seconds from 100 to 1900 cm⁻¹ for the specific identification.

RESULTS

Ps19 isolation and quantification

The acid-soluble (ASM) and acid-insoluble (AIM) matrixes were obtained by extraction with cold acetic acid. The AIM was separated by denaturalizing electrophoresis and visualized by CBB stain (Figure 1A). The Ps19 protein was identified

Table 1. Conditions for CaCO₃ crystallization *in vitro* in the presence of Ps19.

Tabla 1. Condiciones para la cristalización de CaCO₃ *in vitro* en presencia de Ps19.

Solution	Salt	Cofactor	Molarity of the cofactor (Mm)	pH	Ps19 (µg·µL ⁻¹)	Expected CaCO ₃ polymorph	Reference
1	40 mM CaCl ₂ , 100 mM NaHCO ₃	MgCl ₂	40 or 100	8.2	0.2	Aragonite	(Weiss <i>et al.</i> , 2000)
					0.7		
					1.2		
2	100 mM Na ₂ CO ₃	CaCl ₂	40 or 100	8.2	0.2	Calcite	(Declat <i>et al.</i> , 2016)
					0.7		
					1.2		
3	40 mM CaCl ₂ , 100 mM Na ₂ CO ₃	MgSO ₄	40 or 100	8.2	0.2	Aragonite	(Nielsen <i>et al.</i> , 2016)
					0.7		
					1.2		
4	100 mM NaHCO ₃	CaCl ₂ and MgCl ₂	40 or 100	8.2	0.2	Calcite/ aragonite	(Loste <i>et al.</i> , 2003)
					0.7		
					1.2		

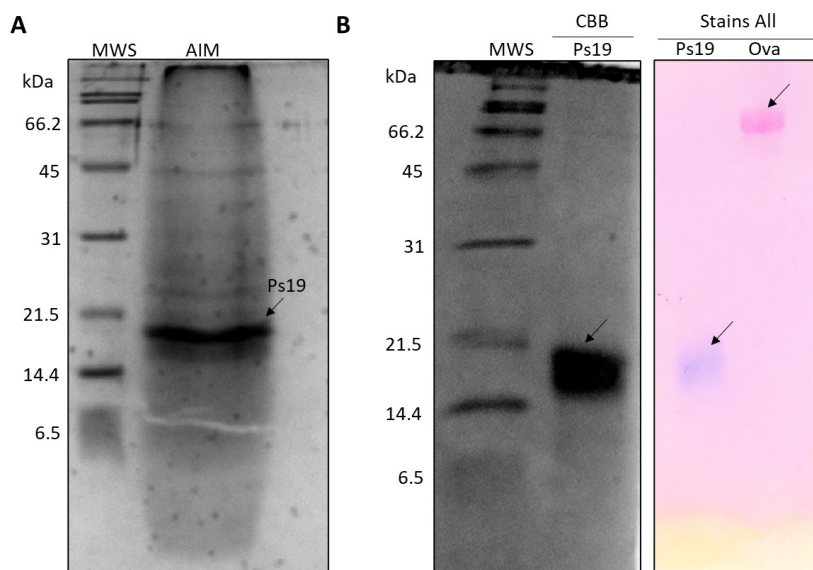


Figure 1. Acetic insoluble matrix (AIM) from the shell of *Pteria sterna*. (A) AIM in a SDS-PAGE 16 % polyacrylamide gel stained with CBB. MWS: molecular weight standard (Bio-Rad 1610317), AIM: acetic-acid insoluble matrix proteins, the arrow indicates the Ps19 protein. (B) Isolated Ps19 shell protein from *P. sterna* and Ca²⁺ binding capability (Stain all). Ova: ovalbumin (negative control).

Figura 1. Matriz acética insoluble (AIM) de la concha de *Pteria sterna*. (A) AIM en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 16 % teñido con CBB. MWS: estándar de peso molecular (Bio-Rad 1610317), AIM: proteínas de matriz insolubles en ácido acético, la flecha indica la proteína Ps19. (B) Proteína de la concha Ps19 de *P. sterna* y capacidad de unión a calcio (tinción Stain all). Ova: Ovoalbúmina (control negativo).

by determining its molecular weight (~19 kDa) through its relative mobility along with the gel.

The Ps19 protein was purified by preparative electrophoresis (Figure 1B). From the four electrophoreses, a total of 576 µg of Ps19 were purified from 3.4 mg of unpurified protein present in the AIM extracted from the pulverized shell, having a protein (Ps19) with a 17 % yield and 94 % purity (Table 2).

The amount of purified Ps19 was determined by pixel densitometry (Figure 1B). The CBB and Stains-All stains corroborated that the isolated protein was Ps19, which had the expected molecular weight (19 kDa) and presented Ca²⁺ binding capability (Figure 1B) as described by Arroyo-Loranca *et al.* (2020).

CaCO₃ crystallization *in vitro*

The modulation of CaCO₃ crystal polymorph formation by Ps19 was evaluated by SEM. The Ps19 protein was able to produce calcite crystals when MgCl₂ was used as a cofactor at 40 and 100 mM (Figure 2). At 40 mM MgCl₂, Ps19 crystallized calcite crystal plates in their typical geometric shape with smooth sides (Figure 2 F-H), which were comparable in size than those observed in the controls (Figure 2E, 3I-K). At 100 mM MgCl₂ (Figure 2), only hexagonal vaterite was formed, plates were more structured, and stacked forming platelet interlocks (white arrow, Figure 2B). Increase of Ps19 concentration displayed crystal inhibition at 40 mM when protein was set at 1.2 µg·µL⁻¹, however, this behavior was not

observed at 100 mM MgCl₂ and CaCO₃ crystals presented diamond shape instead of hexagonal, as seen at 0.2 and 1.2 µg·µL⁻¹ Ps19 concentration.

The addition of Ps19 to the solution containing 40 and 100 mM CaCl₂ did not generate crystals of calcite or aragonite (Figure 3). At 40 mM rod-like crystals were observed (Figure 3F, G), while high CaCl₂ concentration displayed scarce rod-like crystals (Figure 3B) and isolated polycrystalline deposits generating halos or inhibition zones (Figure 3C). The increase of Ps19 concentration at 40 and 100 mM did not produce any significant pattern on crystal deposition.

Saturated solution containing MgSO₄ as source of Mg²⁺ ion resulted in CaCO₃ precipitation as ACC (Figure 4). At 40 mM MgSO₄, ACC polymorph was predominant in the solution, however small aragonite structures were visible at 0.2

Table 2. Ps19 purification from *Pteria sterna* shell.

Tabla 2. Purificación de Ps19 a partir de la concha de *Pteria sterna*.

Species	Step	Total Protein (mg)	Ps19 (mg)	Yield (%)	Purity (%)
<i>Pteria sterna</i>	Crude extract	3.456	3.016	100	87
	Preparative electrophoresis	3.016	0.616	20	94
	Amicon-washed concentrate	0.576	0.576	19	94

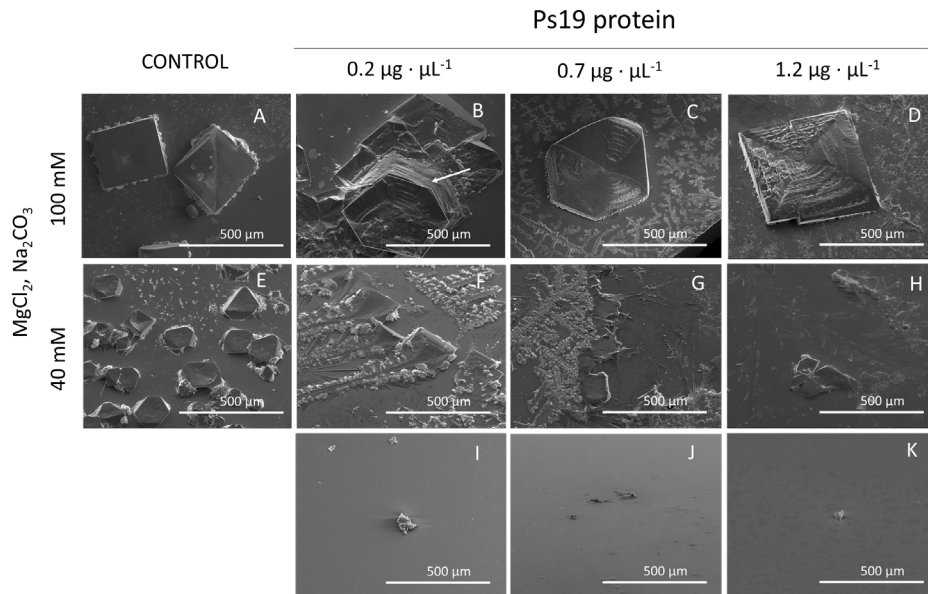


Figure 2. SEM micrographs of calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of 40 mM CaCl_2 , Mg^{2+} ion (40 and 100 mM), 100 mM NaHCO_3 and Ps19 at increasing concentrations ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). First panel from left to right (A, E) Negative controls without Ps19; 100 mM Mg^{2+} ion in presence of (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; 40 mM Mg^{2+} ion in presence of (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) protein alone without salt. Scale bars are 500 μm . Hexagonal structures are shown in white lines, and arrow indicates platelet interlocks. Each picture is representative of three independent crystallization assays.

Figura 2. Micrografías SEM del crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* en presencia de CaCl_2 40 mM, iones Mg^{2+} (40 y 100 mM), NaHCO_3 100 mM y Ps19 a concentraciones crecientes ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Primer panel de izquierda a derecha (A, E) Controles negativos sin Ps19; ion Mg^{2+} 100 mM en presencia de (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; ion Mg^{2+} 40 mM en presencia de (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) proteína sola sin sal. Las barras de escala son de 500 μm . Las estructuras hexagonales se muestran en líneas blancas y la flecha indica interbloques de plaquetas. Cada imagen es representativa de tres ensayos de cristalización independientes.

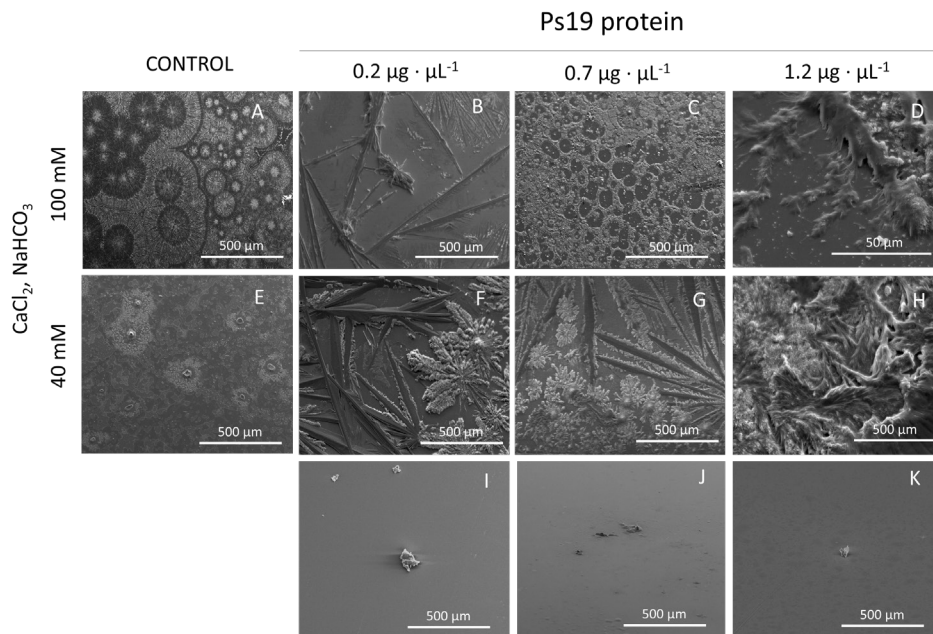


Figure 3. SEM micrographs of calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of Ca^{2+} ion (40 and 100 mM), 100 mM Na_2CO_3 and Ps19 at increasing concentrations ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). First panel from left to right (A, E) Negative controls without Ps19; 100 mM Ca^{2+} ion in presence of Ps19 protein (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; 40 mM Ca^{2+} ion in presence of (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) protein alone without salt. Scale bars are 500 μm . Each picture is representative of three independent crystallization assays.

Figura 3. Micrografías SEM del crecimiento *in vitro* de cristales de carbonato de calcio en presencia de ion Ca^{2+} (40 y 100 mM), Na_2CO_3 100 mM y Ps19 a concentraciones crecientes ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Primer panel de izquierda a derecha (A, E) Controles negativos sin Ps19; ion Ca^{2+} 100 mM en presencia de (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; ion Ca^{2+} 40 mM en presencia de (B) $0.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) $0.7\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) $1.2\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) proteína sola sin sal. Las barras de escala son de 500 μm . Cada imagen es representativa de tres ensayos de cristalización independientes.

and 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19 protein (Figure 4F-H). But, at 100 mM MgSO_4 no rhombohedral or even faceted crystals at all were spotted, instead agglomerations of spheres were observed at all Ps19 concentrations tested (Figure 4B-D).

Finally, when $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ (1:1 ratio) were present in the crystallization assay formed scarce crystal structures and

a thin film was present over all crystal preparations (Figure 5). At 40 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, an aragonite tablet was observed at 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Figure 5G), while at 100 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$, only aragonite crystals were observed at 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Figure 5C,D), which were 100 μm size.

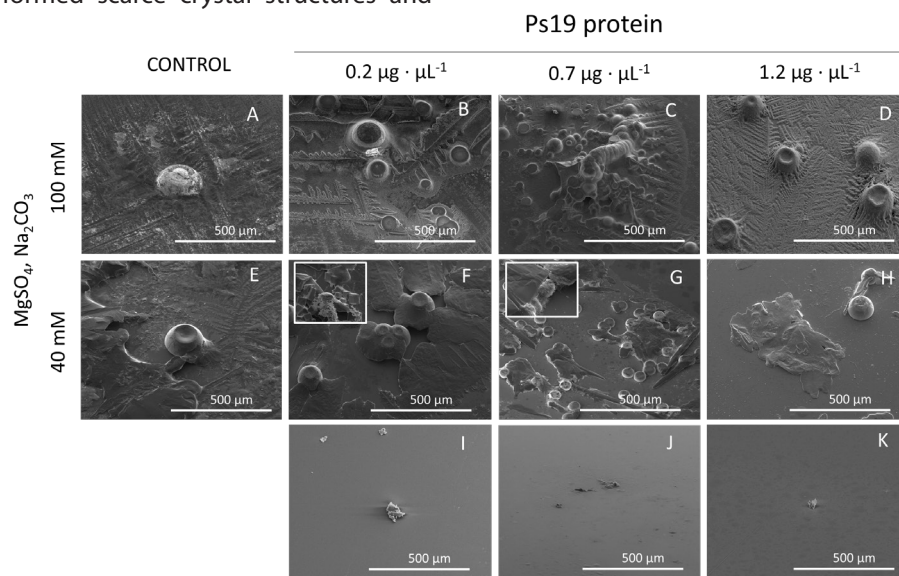


Figure 4. SEM micrographs of calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of 40 mM CaCl_2 , Mg^{2+} ion (40 and 100 mM) as MgSO_4 , 100 mM Na_2CO_3 and Ps19 at increasing concentrations ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). First panel from left to right (A, E) Negative controls without Ps19; 100 mM Mg^{2+} ion in presence of (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; 40 mM Mg^{2+} ion in presence of (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) protein alone without salt. Scale bars are 500 μm , inlets are 50 μm size. Each picture is representative of three independent crystallization assays.

Figura 4. Micrografías SEM del crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* en presencia de CaCl_2 , 40 mM, iones Mg^{2+} (40 y 100 mM) como MgSO_4 , Na_2CO_3 , 100 mM y Ps19 a concentraciones crecientes ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Primer panel de izquierda a derecha (A, E) Controles negativos sin Ps19; ion Mg^{2+} 100 mM en presencia de (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; ion Mg^{2+} 40 mM en presencia de (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) proteína sola sin sal. Las barras de escala son de 500 μm , las entradas tienen un tamaño de 50 μm . Cada imagen es representativa de tres ensayos de cristalización independientes.

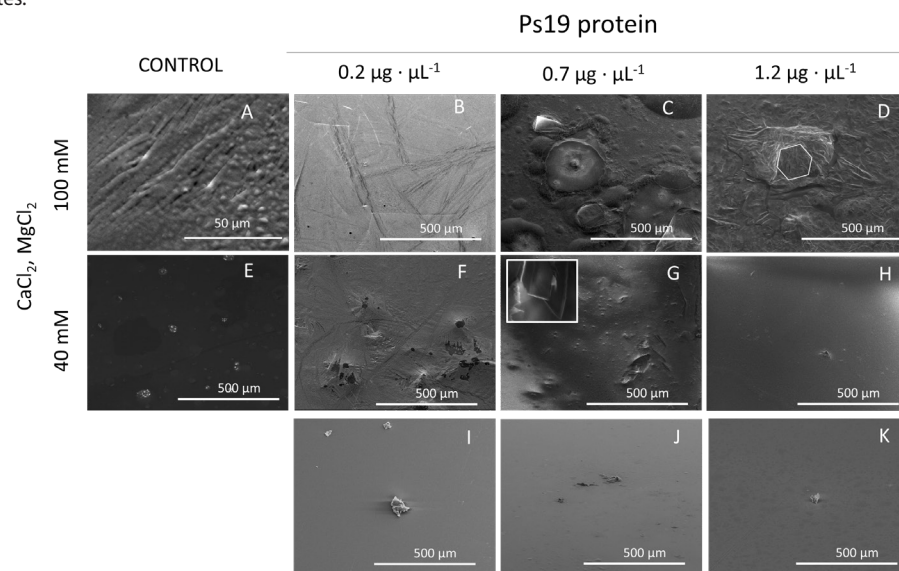


Figure 5. SEM micrographs of calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of CaCl_2 and MgCl_2 (40 and 100 mM), 100 mM NaHCO_3 and Ps19 at increasing concentrations ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). First panel from left to right (A, E) Negative controls without Ps19; 100 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ in presence of (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; 40 mM $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ in presence of (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) protein alone without salt. Scale bars are 500 μm , inlets are 50 μm size. Each picture is representative of three independent crystallization assays.

Figura 5. Micrografías SEM del crecimiento *in vitro* de cristales de carbonato de calcio en presencia de CaCl_2 y MgCl_2 (40 y 100 mM), NaHCO_3 , 100 mM y Ps19 a concentraciones crecientes ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Primer panel de izquierda a derecha (A, E) Controles negativos sin Ps19; $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ 100 mM en presencia de (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ 40 mM en presencia de (B) 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (C) 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (D) 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19; (I-K) proteína sola sin sal. Las barras de escala son de 500 μm , las entradas tienen un tamaño de 50 μm . Cada imagen es representativa de tres ensayos de cristalización independientes.

Raman analysis

Raman measurements confirmed the presence of CaCO₃ polymorphs (Figure 6). The spectra show characteristics peaks belonging to the internal vibration mode of CO₃²⁻ (at around 1080 cm⁻¹) and the related between Ca²⁺ with CO₃²⁻ (Han *et al.*, 2017). The signal differences from 100 to 400 cm⁻¹ derived from the different vibration modes of Ca²⁺ and CO₃²⁻ in calcite and aragonite. In aragonite, the interatomic distances between Ca²⁺ and CO₃²⁻ are smaller than that of calcite; hence, the bonds between Ca²⁺ and CO₃²⁻ are stronger and the Raman signals appear at lower-frequency vibrational mode than that of calcite (Arroyo-Loranca *et al.*, 2020). Moreover, is interesting to observe the presence of a triplet formed in the region from 1070 to 1090 cm⁻¹. These vibrations are characteristic of the vaterite formation that was confirmed by the additional vibrations modes from 700 to 790 cm⁻¹ belonging to the internal translational modes of in-plane bending of the carbonate ions in vaterite (Soldati *et al.*, 2008). In this sense, Figure 6 shows the Raman spectra of CaCO₃ polymorphs when MgCl₂ was used as a cofactor at 40 and 100 mM. At 40 mM, the control (solution without protein) shows a triplet

from 1070 to 1090 cm⁻¹ assigned to the vaterite formation, while a protein concentration of 0.2 and 0.7 µg·µL⁻¹ show vibration modes in the range of 700 and 200 cm⁻¹ assigned to the calcite formation.

The Raman spectra of samples using CaCl₂ as a cofactor are shown in Figure 7. Here we observe a single vibration mode in the region from 1060 to 1080 cm⁻¹ corresponding to CO₃²⁻ which indicates only a CO₃²⁻ deposition without any structured crystals formation as can be observed by SEM (Figure 3). Figure 8 shows the Raman spectra of samples using MgSO₄ as a cofactor. The spectra show vibration modes in the region from 900 to 1070 cm⁻¹ and from 230 to 640 cm⁻¹. These vibrations modes can be assigned to ACC polymorphs. Finally, the use of CaCl₂ and MgCl₂ as a cofactor, do not show any crystal formation.

DISCUSSION

The shell growth in Mollusk has been described to start with the precipitation of ACC, which is known to surround aragonite platelets in gastropods (e.g. *Haliotis laevigata*) and bivalves (e.g. *Pinctada margaritifera* and *Atrina rigida*) indica-

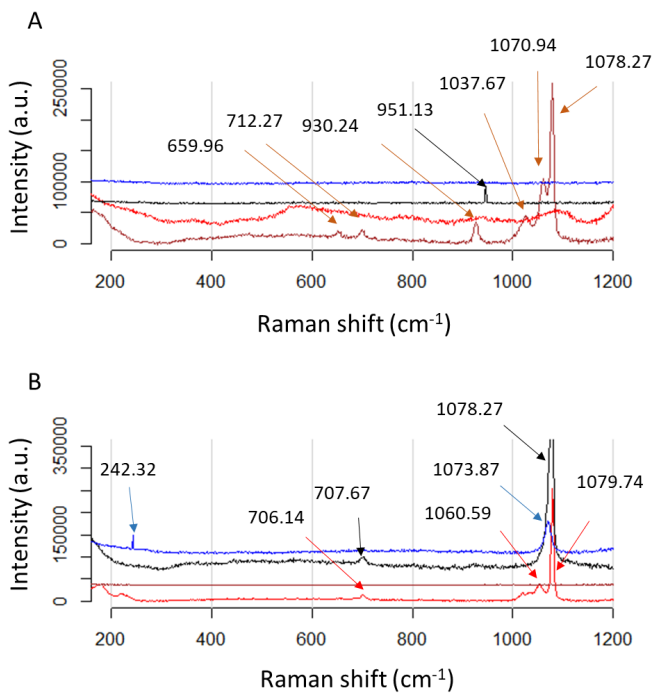


Figure 6. Raman spectra of calcite and vaterite formation by using Ps19 protein and MgCl₂ as a cofactor. Calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of MgCl₂ Na₂CO₃. (A) 100 mM and (B) 40 mM, respectively. Color line indicate salts preparations, red line: salt without protein added, black: salt in the presence of 0.2 µg·µL⁻¹, blue: salt in the presence of 0.7 µg·µL⁻¹, brown: salt in the presence of 1.2 µg·µL⁻¹. Color arrows indicate the peaks for each salt preparation.

Figura 6. Espectros Raman de formación de calcita y vaterita usando proteína Ps19 y MgCl₂ como cofactor. Crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* en presencia de MgCl₂ Na₂CO₃. (A) 100 mM y (B) 40 mM, respectivamente. La línea de color indica preparaciones de sales, línea roja: sal sin proteína añadida, negra: sal en presencia de 0.2 µg·µL⁻¹, azul: sal en presencia de 0.7 µg·µL⁻¹, marrón: sal en presencia de 1.2 µg·µL⁻¹. Las flechas de color indican los picos para cada preparación de sal.

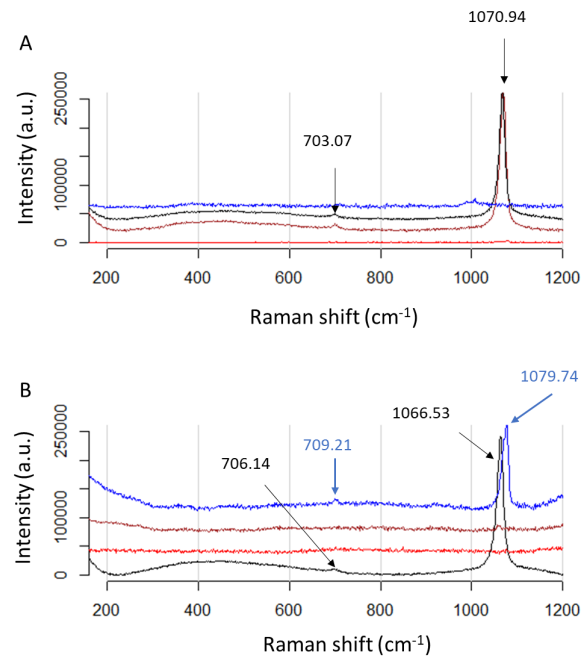


Figure 7. Raman spectra of carbonates deposition by using Ps19 protein and CaCl₂ as a cofactor. Calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of CaCl₂ NaHCO₃ (A) 100 mM and (B) 40 mM, respectively. Color line indicate salts preparations, red line: salt without protein added, black: salt in the presence of 0.2 µg·µL⁻¹, blue: salt in the presence of 0.7 µg·µL⁻¹, brown: salt in the presence of 1.2 µg·µL⁻¹. Color arrows indicate the peaks for each salt preparation.

Figura 7. Espectros Raman de deposición de carbonatos usando proteína Ps19 y CaCl₂ como cofactor. Crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* en presencia de CaCl₂ NaHCO₃ (A) 100 mM y (B) 40 mM, respectivamente. La línea de color indica preparaciones de sales, línea roja: sal sin proteína añadida, negra: sal en presencia de 0.2 µg·µL⁻¹, azul: sal en presencia de 0.7 µg·µL⁻¹, marrón: sal en presencia de 1.2 µg·µL⁻¹. Las flechas de color indican los picos para cada preparación de sal.

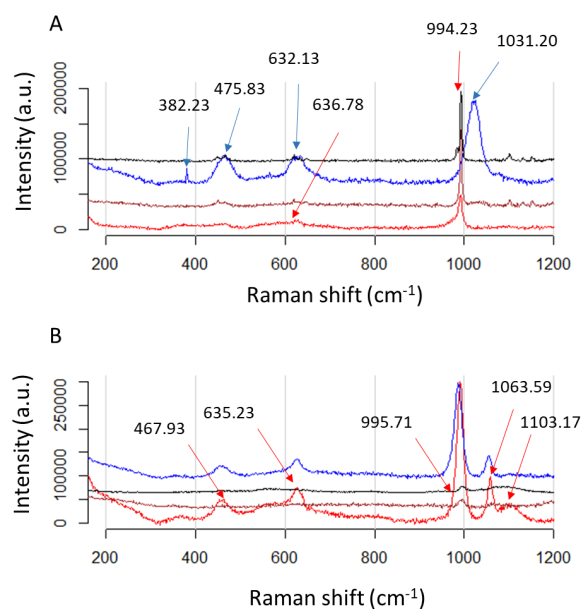


Figure 8. Raman spectra of ACC polymorphs by using Ps19 protein and MgSO_4 as a cofactor. Calcium carbonate crystals growth *in vitro* in the presence of A) 100 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ or B) 40 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$. Color line indicate salts preparations, red line: salt without protein added, black: salt in the presence of 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, blue: salt in the presence of 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, brown: salt in the presence of 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Color arrows indicate the peaks for each salt preparation.

Figura 8. Espectros Raman de polimorfos de ACC usando proteína Ps19 y MgSO_4 como cofactor. Crecimiento de cristales de carbonato de calcio *in vitro* en presencia de A) 100 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$, B) 40 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$. La línea de color indica preparaciones de sales, línea roja: sal sin proteína añadida, negra: sal en presencia de 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, azul: sal en presencia de 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, marrón: sal en presencia de 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Las flechas de color indican los picos para cada preparación de sal.

ting a nascent growing platelet (Nassif *et al.*, 2005; Rousseau *et al.*, 2009). ACC is a highly metastable phase, which is often found hydrated, and after dehydration, transforms to calcite, aragonite, or vaterite (Radha *et al.*, 2010). Divalent ions have been found to affect the crystallization rates and pathways of ACC (Tobler *et al.*, 2015). In Mollusk shells, Mg^{2+} ion is 2.55 % of their weight (Huang *et al.*, 2018). This ion is known to stabilize ACC forming a complex (Mg-ACC) and reducing their reactivity to form polymorphs or calcite or aragonite, however, aragonite can be detectable since Mg^{2+} is known to suppress calcite growth (Davis *et al.*, 2000). In our study, the mixture of the Ps19 with the saturated solution containing 40 and 100 mM MgSO_4 , respectively (Figure 4), resulted in the formation of imperfect spherical morphologies, which has been previously described (Xu *et al.*, 2014). However, this was not observed when MgCl_2 was used as a cofactor (Figure 2). This may be explained by the hydration capability of MgSO_4 (heptahydrate) compared to MgCl_2 (hexahydrate), acting as an inhibitor of calcite by occlusion of Mg inside the platelet, leading a less hydrated form of CaCO_3 (Nielsen *et al.*, 2016).

The transition of ACC to calcite and aragonite in Mollusk is modulated by Mg^{2+} ions and SMPs (Ma and Feng, 2015).

In our study, Ps19 was able to induce well-formed aragonite platelets, being the bigger aragonite crystal those found at 100 mM MgCl_2 (Figure 2). However, the inhibition observed at 40 mM MgCl_2 , and the less structured aragonite crystal at 100 mM MgCl_2 when 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ps19 was used (Figure 2D, H), suggest that Ps19 can act as an inhibitor of crystal growth besides its role as a crystallization inducer, this dual role may be ion and protein concentration-dependent as has been suggested previously (Arroyo-Loranca *et al.*, 2020). Similar results have been observed in Prismaticin-14, Pif97, KRMP-3, and rPNU9 from *P. fucata* (Suzuki *et al.*, 2004; Bahn *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2019).

SMPs related to prismatic layer growth of the shell have been found to form strictly calcite crystal at low CaCl_2 concentration and to be able to inhibit aragonite platelet growth, e.g. Prismaticin-39 from *P. fucata* (Kong *et al.*, 2009). However, Ps19 have been proved previously to produce calcite (Arroyo-Loranca *et al.*, 2020) at low CaCl_2 . Interestingly, putative inhibition zones of crystal growth were observed in this study at high CaCl_2 concentration and 0.7 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of Ps19 (Figure 3C), a behavior also been observed in other SMPs such as rPif97 from *P. fucata* (Bahn *et al.*, 2015), suggesting that calcite crystal deposition may be protein dose-dependent. The capability of Ps19 to produce calcite and aragonite using different ions suggest that Ps19 is associated to the formation of the prismatic and nacre layer in *P. sterna*, as has been described in other SMPs such as Lys-rich matrix protein family from *P. fucata* (Liang *et al.*, 2016) and nacrein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Song *et al.*, 2014).

Besides modulation by a single ion, the growth of calcite and aragonite is dependent on the Mg^{2+} and Ca^{2+} molar ratio (Loste *et al.*, 2003). An increase in the Mg^{2+} molar ratio leads to the growth of a hydrated phase of CaCO_3 at the surface of the solution, while at the base of the crystallization assay produces calcite and aragonite from 2:1, 3:1 and 4:1 of Mg:Ca (Loste *et al.*, 2003). For Ps19, a molar ratio of 1:1 leads to the production of a thin film and scarce crystal growth with undefined structures at both concentration, 40 and 100 mM, however calcitic and aragonite structures were visible at 0.7 and 1.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of Ps19, these results lead to the hypothesis that Ps19 may react with the salts and inhibit the crystal growth of either calcite or aragonite, and the crystals formed are the result of dehydrated spots in the crystallization assay, however further experiments are required corroborate this hypothesis.

CONCLUSIONS

In contrast to other SMPs described in Mollusk, which promote one kind of calcium carbonate polymorph (e.g. aragonite or calcite), Ps19 is a novel protein capable to induce calcite and aragonite crystals in a dose-dependent manner at different ion concentrations, acting as a promoter of aragonite in presence of MgCl_2 and as a promoter of calcite in presence of CaCl_2 , suggesting that Ps19 may play an important role in the prismatic and nacre layer of the shell of *P. sterna*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Delia Irene Rojas Posadas for her technical assistance, as well as to M.C. Beatriz Adriana Rivera Escoto for the measurements with the Raman spectrometer from the National Laboratory for Nanoscience and Nanotechnology Research (LINAN) at IPICYT, A.C.; also to CONACyT for the fellowship grant number 358437.

REFERENCES

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F. and Weiner, S. 2006. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry*. 12: 980-987.
- Addadi, L., Raz, S. and Weiner, S. 2003. Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Advanced Materials*. 15: 959-970.
- Arroyo-Loranca, R. G., Hernandez-Saavedra, N. Y., Hernandez-Adame, L. and Rivera-Perez, C. 2020. Ps19, a novel chitin binding protein from *Pteria sterna* capable to mineralize aragonite plates *in vitro*. *PLoS One*. 15: 1-15.
- Bahn, S. Y., Jo, B. H., Choi, Y. S. and Cha, H. J. 2017. Control of nacre biomineralization by pif80 in pearl oyster. *Science Advances*. 3: e1700765.
- Bahn, S. Y., Jo, B. H., Hwang, B. H., Choi, Y. S. and Cha, H. J. 2015. Role of pif97 in nacre biomineralization: *In vitro* characterization of recombinant pif97 as a framework protein for the association of organic-inorganic layers in nacre. *Crystal Growth & Design*. 15: 3666-3673.
- Davis, K. J., Dove, P. M. and De Yoreo, J. J. 2000. The role of Mg²⁺ as an impurity in calcite growth. *Science*. 290: 1134-1137.
- Declet, A., Reyes, E. and Suárez, O. M. 2016. Calcium carbonate precipitation: A review of the carbonate crystallization process and applications in bioinspired composites. *Reviews on Advanced Materials Science*. 44: 87-107.
- Demichelis, R., Schuitemaker, A., Garcia, N. A., Koziara, K. B., De La Pierre, M., Raiteri, P. and Gale, J. D. 2018. Simulation of crystallization of biominerals. *Annual Review of Materials Research*. 48: 327-352.
- Du, J., Liu, C., Xu, G., Xie, J., Xie, L. and Zhang, R. 2018. Fam20c participates in the shell formation in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Scientific Reports*. 8: 3563.
- Evans, J. S. 2019. Composite materials design: Biomineralization proteins and the guided assembly and organization of biomineral nanoparticles. *Materials*. 12: 581-591.
- Green, M. R., Pastewka, J. V. and Peacock, A. C. 1973. Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye. *Analytical Biochemistry*. 56: 43-51.
- Han, D., Kim, D., Choi, S. and Yoh, J. J. 2017. A novel classification of polymorphs using combined IR and Raman spectroscopy. *Current Optics and Photonics*. 1: 402-411.
- Huang, J., Liu, C., Xie, L. and Zhang, R. 2018. Amorphous calcium carbonate: A precursor phase for aragonite in shell disease of the pearl oyster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 497: 102-107.
- Kocot, K. M., Aguilera, F., McDougall, C., Jackson, D. J. and Degnan, B. M. 2016. Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: Insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*. 13: 23.
- Kong, J., Liu, C., Yang, D., Yan, D., Chen, Y., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L. and Zhang, R. 2019. A novel basic matrix protein of *Pinctada fucata*, pnu9, functions as inhibitor during crystallization of aragonite. *CrystEngComm*. 21: 1250-1261.
- Kong, Y., Jing, G., Yan, Z., Li, C., Gong, N., Zhu, F., Li, D., Zhang, Y., Zheng, G., Wang, H., Xie, L. and Zhang, R. 2009. Cloning and characterization of prislkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 10841-10854.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 227: 680-685.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L. and Weiner, S. 2001. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *Journal of Structural Biology*. 135: 8-17.
- Liang, J., Xie, J., Gao, J., Xu, C.-Q., Yan, Y., Jia, G.-C., Xiang, L., Xie, L.-P. and Zhang, R.-Q. 2016. Identification and characterization of the lysine-rich matrix protein family in *Pinctada fucata*: Indicative of roles in shell formation. *Marine Biotechnology*. 18: 645-658.
- Loste, E., Wilson, R., Seshadri, R. and Meldrum, F. C. 2003. The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *Journal of Crystal Growth*. 254: 206-218.
- Ma, Y. and Feng, Q. 2015. A crucial process: Organic matrix and magnesium ion control of amorphous calcium carbonate crystallization on b-chitin film. *CrystEngComm*. 17: 32-39.
- Meldrum, F. C. and Colfen, H. 2008. Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chemical Reviews*. 108: 4332-4432.
- Montagnani, C., Marie, B., Marin, F., Belliard, C., Riquet, F., Tayalé, A., Zanella-Cleon, I., Fleury, E., Gueguen, Y., Piquemal, D. and Cochennec-Laureau, N. 2011. Pmarg-pearlin is a matrix protein involved in nacre framework formation in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *ChemBioChem*. 12: 2033-2043.
- Nassif, N., Pinna, N., Gehrke, N., Antonietti, M., Jager, C. and Colfen, H. 2005. Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 12653-12655.
- Nielsen, M. R., Sand, K. K., Rodriguez-Blanco, J. D., Bovet, N., Generosi, J., Dalby, K. N. and Stipp, S. L. S. 2016. Inhibition of calcite growth: Combined effects of Mg²⁺ and SO₄²⁻. *Crystal Growth & Design*. 16: 6199-6207.
- Pan, C., Fang, D., Xu, G., Liang, J., Zhang, G., Wang, H., Xie, L. and Zhang, R. 2014. A novel acidic matrix protein, pfn44, stabilizes magnesium calcite to inhibit the crystallization of aragonite. *Journal of Biological Chemistry*. 289: 2776-2787.
- Politi, Y., Metzler, R. A., Abrecht, M., Gilbert, B., Wilt, F. H., Sagi, I., Addadi, L., Weiner, S. and Gilbert, P. U. P. A. 2008. Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 17362-17366.
- Radha, A. V., Forbes, T. Z., Killian, C. E., Gilbert, P. U. P. A. and Navrotsky, A. 2010. Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 16438-16443.
- Raz, S., Weiner, S. and Addadi, L. 2000. Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: Possible biological implications. *Advanced Materials*. 12: 38-42.

- Rousseau, M., Meibom, A., Geze, M., Bourrat, X., Angellier, M. and Lopez, E. 2009. Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Journal of Structural Biology*. 165: 190-195.
- Soldati, A. L., Jacob, D. E., Wehrmeister, W. and Hofmeister, W. 2008. Structural characterization and chemical composition of aragonite and vaterite in freshwater cultured pearls. *Mineralogical Magazine*. 72: 579-592.
- Song, X., Liu, Z., Wang, L. and Song, L. 2019. Recent advances of shell matrix proteins and cellular orchestration in marine molluscan shell biomineralization. *Frontiers in Marine Science*. 6.
- Song, X., Wang, X., Li, L. and Zhang, G. 2014. Identification two novel nacrein-like proteins involved in the shell formation of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Biology Reports*. 41: 4273-4278.
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T. and Nagasawa, H. 2004. Characterization of prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical Journal*. 382: 205-213.
- Tobler, D. J., Rodriguez-Blanco, J. D., Dideriksen, K., Bovet, N., Sand, K. K. and Stipp, S. L. S. 2015. Citrate effects on amorphous calcium carbonate (acc) structure, stability, and crystallization. *Advanced Functional Materials*. 25: 3081-3090.
- Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K. and Fritz, M. 2000. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267: 17-21.
- Wilt, F. H. 2005. Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures. *Developmental Biology*. 280: 15-25.
- Wolf, S., Marin, F., Marie, B., Hamada, S. B., Silva, P., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D. and Le Roy, N. 2013. Shellome: Proteins involved in mollusc shell biomineralization - diversity, functions. In: S. Watabe, K. Maeyama and H. Nagasawa, editors. *Recent advances in pearl research*: Terrapub. pp. 149-166.
- Xie, J., Liang, J., Sun, J., Gao, J., Zhang, S., Liu, Y., Xie, L. and Zhang, R. 2016. Influence of the extrapallial fluid of *Pinctada fucata* on the crystallization of calcium carbonate and shell biomineralization. *Crystal Growth & Design*. 16: 672-680.
- Xu, N., Li, Y., Zheng, L., Gai, Y., Yin, H., Zhao, J., Chen, Z., Chen, J. and Chen, M. 2014. Synthesis and application of magnesium amorphous calcium carbonate for removal of high concentration of phosphate. *Chemical Engineering Journal*. 251: 102-110.



A simple solution method to prepare VO₂:Co²⁺ precursors for thin film deposition by solution-processing method

Un método simple de solución para preparar películas delgadas de VO₂:Co²⁺ para la deposición mediante el método de procesamiento en solución

F. Hernandez-Guzman^a, G. Suarez-Campos^{a,b,*}, D. Cabrera-German^a, M.A. Millan-Franco^c, H. Hu^c, M.A. Quevedo-Lopez

^{a,d}, M. Sotelo-Lerma^{a*}

^a Department of Research in Polymers and Materials, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.

^b Department of Chemical Engineering and Metallurgy, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.

^c Institute of Renewable Energies, National Autonomous University of Mexico, Temixco, Morelos, Mexico

^d Materials Science and Engineering Department, University of Texas at Dallas, Richardson, United States.

ABSTRACT

Solution-processing is a low-cost solution method to prepare a variety of organic or inorganic thin films. For metal oxide compounds, a solution-processing solution of an organometallic compound is frequently used as a precursor to be spin coated, followed by a thermal annealing to form metal oxide. In this work, vanadium oxide powders are obtained from a simple acid-base reaction, and then they are dispersed in isopropyl alcohol to form a solution for spin-coating. Different amount of cobalt salt are also added together with VO_x into isopropyl alcohol to form VO_x:Co²⁺ solutions. After thermal annealing at 200 °C, continuous transparent thin films are obtained. Optical, structural, morphological and chemical binding energies of those films are analyzed. It is found that amorphous VO₂:Co²⁺ compound is formed in those films with V:Co atomic ratios between 6.6:1 and 1.6:1. Optical absorption onsets of those films are around 2.3 eV. An interesting interconnected porous morphology is observed when the atomic ratio of V:Co is around 4.9:1. It is concluded that porous amorphous cobalt doped vanadium oxide thin films can be obtained from a spin-coating process at low annealing temperature from a simple solution without any complex agent.

Keywords: cobalt doped vanadium oxide, spin-coated thin films, porous morphology, solution processing without ligands.

RESUMEN

El procesamiento de soluciones es un método de bajo costo para preparar una variedad de películas delgadas orgánicas o inorgánicas. Para compuestos de óxidos metálicos, un procesamiento de solución de un compuesto organometálico se usa con frecuencia como solución precursora para ser recubierta por rotación, seguida de un tratamiento térmico para formar el óxido metálico. En este trabajo se obtienen polvos de óxido de vanadio a partir de una simple reacción ácido-base, y luego se dispersan en alcohol isopropílico para formar una solución para spin-coating. También se agregan diferentes cantidades de sal de cobalto junto con VO_x en alcohol isopropílico para formar soluciones de VO_x:Co²⁺. Después

del tratamiento térmico a 200 °C, se obtienen películas delgadas transparentes. Se analizan las propiedades ópticas, estructurales, morfológicas y químicas. Se encontró que el compuesto VO₂:Co²⁺ es amorfo y se obtiene con una relación atómica V:Co variada de 6.6:1-1.6:1. El material presenta una absorción óptica alrededor de 2.3 eV. Se observa una interesante morfología porosa interconectada cuando la relación atómica de V:Co es ~4.9:1. Se concluye que se pueden obtener películas delgadas amorfas porosas de VO₂:Co²⁺ a partir del spin-coating a una baja temperatura de tratamiento utilizando una solución simple sin agente complejante.

Palabras clave: óxido de vanadio dopado con cobalto, películas delgadas mediante recubrimiento centrifugo, morfología porosa, procesamiento de la solución sin complejantes.

INTRODUCTION

Vanadium oxides (VO_x) and VO_x doped with different metal oxides are interesting semiconductor materials because of their abundance in the Earth's crust, as well as its multi-oxidation states and various crystalline structures (Silversmit *et al.*, 2004, 2006). As a semiconductor material, VO_x shows a band gap ~2.6-3.5 eV that makes it a good semiconductor material for diverse electronic application. In the literature, VO_x thin films have been deposited with different methods for diverse potential applications employing techniques such as: magnetron sputtering and spin-coating for thermochromic applications (Ho *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2021); pulsed laser deposition for cathodes in Lithium and sodium-ion batteries (Petnikota *et al.*, 2018); sprayed solution for NO₂ gas sensing (Khatibani, Abbasi and Rozati, 2016; Mane and Moholkar, 2017); solution-processing method for smart windows applications (Peng *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2021).

On the other hand, modifications of optical or structural properties of semiconductor thin films are necessary to improve application of these materials. Which by adding a different type of metal ions into a VO_x host matrix, known as a doping process, is one of the most effective ways to modify vanadium oxide structure, leading to different electrochemi-

*Author for correspondence: G Suarez Campos, M Sotelo-Lerma
e-mail: guillermo.suarez@unison.mx, merida.sotelo@unison.mx

Received: November 3, 2022

Accepted: March 6, 2023

cal, catalytic, and magnetic properties (Lu *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021; Geng *et al.*, 2022). Metal doped vanadium oxide thin films have been obtained with different deposition techniques: Y-doped VO_x thin films by DC reactive magnetron sputtering for electrical modulation applications (Zhou *et al.*, 2020); Cs-doped VO_x thin films deposited by spun-cast as a hole extraction layer in perovskite solar cells (Yao *et al.*, 2018); Fe-doped VO_x by sol-gel spin-coated for electrochromic device applications (Bae, Koo and Ahn, 2019); In-doped VO_x thin films obtained by spray pyrolysis coating system for optical transparency modulation (Tabatabai Yazdi, Pilevar Shahri and Shafei, 2021); Co-doped VO_x thin films by microwave irradiation process for battery-type supercapacitor applications (Liu *et al.*, 2020), among others (Ji *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

Solution-processing spin-coating is an economical method to obtain homogeneous pure or doped VO_x thin films. Compared to other chemical solution deposition methods, this method has the advantage that it enables the deposition of metal oxide thin films without seed layer on substrates such as glass, fluorine doped tin oxide (FTO), indium doped tin oxide (ITO) or coated polyethylene (PET) for transparent or flexible electronics applications (Hajzeri *et al.*, 2012). In particular, metal ion doping in VO_x thin films could be an in-situ process in a spin-coating method by adding the metal source into the vanadium precursor solution. However, expensive organometallic compounds are usually employed to prepare metal precursor solutions. In this work, we propose a simple method to prepare vanadium oxide and cobalt doped vanadium oxide solutions, without the use of organometallic compound or any complex agent that would result in a slow metal cation release, and an increased time and temperature deposition. Chemical photoelectron analysis of vanadium oxide samples, with or without cobalt doping, confirms the formation of a vanadium oxide VO₂ compound in the film samples. Cobalt oxide CoO also prevails in VO₂:Co²⁺ samples, with some neighboring atoms arranged in a short-range order. Porous surface of VO₂:Co²⁺ thin films can be obtained, giving an optical absorption onset at 2.3 eV.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Synthesis of VO_x powders and solution

Precursor solutions for VO_x powders were prepared by using 0.1 M solution of vanadium (IV) oxide sulfate hydrate (VOSO₄·xH₂O) and 1 M solution of sodium hydroxide (NaOH), as previously suggested [25]. These two precursor solutions were mixed, resulting in a blue color solution with a pH ~2 tested with a MColorHast™. After that, the blue solution was heated at 80 °C for 3 h to obtain VO_x precipitates. These precipitates were dispersed in methanol to dissolve possible impurities and then centrifuged. After centrifugation, VO_x precipitates were dried at 80 °C for 2 h to obtain VO_x powders.

To prepare a VO_x sol-gel solution, VO_x powders were dispersed in isopropyl alcohol under ultrasonic vibration at room temperature for 10 min. Then, the mixture solution was filtered with a cotton filter to remove the undispersed precipitates

and obtain a transparent solution for thin film deposition by spin-coating. Pure VO_x films were called samples S₁.

Preparation of VO_x:Co solutions

To obtain cobalt doped VO_x precursor solutions, dried VO_x powders and CoCl₂·6H₂O salt were dispersed/dissolved in isopropyl alcohol. Then, the solutions were subjected to ultrasonic vibration at room temperature for 10 min. Finally, the solutions were filtered with a cotton filter to remove the undispersed precipitates and obtain transparent VO_x:Co solutions for thin film deposition by spin-coating. Four VO_x:Co solutions were prepared with VO_x/CoCl₂·6H₂O weight ratios of 0.7/0.3, 0.5/0.5, 0.3/0.7 and 0.1/0.9, called samples S₂, S₃, S₄ and S₅, respectively.

VO_x and VO_x:Co thin film deposition

The five precursor solutions, VO_x and VO_x/Co, were used to form thin films by spin-coating. Microscope glass slides from VE-P10 Velab™, to be used as substrates for vanadium oxide solutions, were washed with Alconox® detergent, rinsed with distilled water and air-dried. The clean substrates were placed in the Chemat Technology Spin-Coated KW-4A, 50 μL of the VO_x or VO_x:Co solutions were deposited at 2500 rpm for 2 min on the glass substrates. The obtained coatings were thermally annealed in air at 200 °C for 1 h and became solid thin films.

Thin films characterizations

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to assess the chemical composition of the films. The tool employed was PHI 5000 Versa Probe II, with a monochromatic Al Kα (1486.6 eV) X-ray source with a 0.1 eV step size and a constant pass energy of 23.50 eV. The scale of binding energies was corrected by calibrating the main C 1s peak at a binding energy of 284.8 eV. Atomic compositions of VO_x/Co films were estimated from the XPS results. Crystalline structures of VO_x/Co films were probed with X-ray diffraction (XRD) employing a Rigaku DMAX-2200 diffractometer equipped with a Cu Kα (λ = 1.54 Å) X-ray source. A Jeol JSM-7800F field emission scanning electron microscope (FE-SEM) was used to evaluate the surface morphology of the films. The surface morphology of each film sample was analyzed by atomic force microscopy (AFM) with a Veeco Dimension Icon, Bruker instrument. Optical transmittance spectra of VO_x/Co films were measured with a Perkin Elmer Lambda 20 UV-visible spectrometer. Thicknesses of VO_x and VO_x:Co thin films were measured with an Ambios Technology XP 200 profilometer.

RESULTS AND DISCUSSION

Profilometry and main characteristics

The first assessment of the possible formation of continuous VO_x and VO_x:Co thin films from the above mentioned precursor solutions is film thickness measurement by profilometry. Table 1 lists the five types of VO_x:Co thin films with their respective thickness. In the Alpha-Step profiles of all film samples, large grains of 100 to 400 nm of height were observed

ved and were embedded in continuous solid coatings with thickness from 133 to 246 nm.

Table 1. Thickness, band gap and V:Co atomic ratio of VO_x :Co film samples.
Tabla 1. Grosor, brecha de banda y proporción atómica V:Co de muestras VO_x :Co.

Sample name	Weight ratio ($\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O} / \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Thickness (nm)	Atomic ratio of V:Co
S_1	1/0	152 ± 44	1:0
S_2	0.7/0.3	133 ± 39	6.6:1
S_3	0.5/0.5	123 ± 19	4.9:1
S_4	0.3/0.7	133 ± 26	2.9:1
S_5	0.1/0.9	246 ± 11	1.6:1

Optical properties

Optical transmittance spectra of VO_x :Co thin films can be appreciated in Figure 1a with transmittance percentage of 65 - 75 % in the 800 -1350 nm wavelength (λ) range. The main influence of Co^{2+} inclusion is observed in UV-A to blue region, at 325 - 500 nm, as reported elsewhere (Hajzeri *et al.*, 2012; Martínez-Gil *et al.*, 2020). Furthermore, samples with larger Co^{2+} concentration, such as S_4 and S_5 , show lower transmittance at the visible region (400 - 700 nm). Optical absorption coefficient spectrum of each film sample, $\alpha(\lambda)$ (Figure 1b), is calculated from the simplified Beer-Lambert equation: $\alpha = -\frac{1}{d} \ln(T)$, where d is film thickness and $T(\lambda)$ the transmittance spectrum. The optical absorption onset (or band gap E_g) value is estimated by intersection of two straight fitting lines. The E_g values of pure vanadium oxide and vanadium with different amounts of Co^{2+} , are around 2.3 eV, which is very close to that previously reported for V_2O_5 [27]. It is also observed that the absorption coefficients of all the cobalt doped vanadium oxide thin films (from S_2 to S_5) are higher compared to the pure vanadium oxide sample (S_1), keeping the same forms of the spectra. Higher absorption region (> 3.8 eV) in these samples should be related to the glass substrate absorption.

X-ray diffraction

X-ray diffraction pattern of VO_x film sample (S_1) is presented in Figure 2, which appears to correspond to an amorphous material due to the broad signal around 22° , plus a monoclinic phase of $\text{HNaV}_6\text{O}_{16} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ with the plane orientation (100) at around $2\theta \sim 8^\circ$ (JCPDS# 49-0996 (Channu *et al.*, 2011)). This crystalline compound could be a residual from $\text{VOSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$, reaction and was not be eliminated during the 200 °C annealing or the thin film processing. Interestingly, after Co^{2+} addition, the reflection peak around $2\theta \sim 8^\circ$ gradually reduces. The higher the concentration of Co^{2+} , the smaller the intensity of that peak, until its complete elimination in the sample with the highest concentration of Co^{2+} (sample, S_5). S_5 shows the diffraction pattern typical of an amorphous film, hence it is a predominantly amorphous material. Since no diffraction peaks of CoO_x or VCoO_x compounds appear in the five VO_x : Co^{2+} samples, it seems that low temperature annealing leads to amorphous materials, as indicated in (Hu *et al.*, 2017; Martínez-Gil *et al.*, 2020).

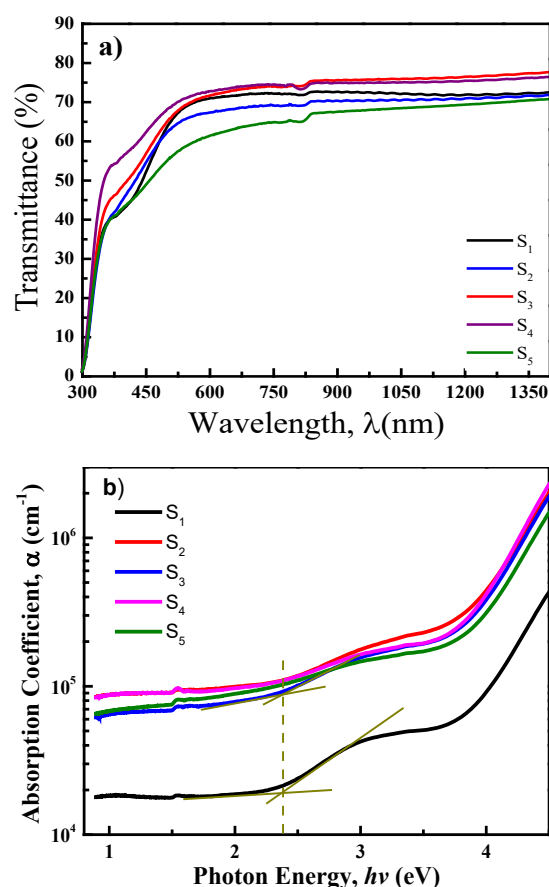


Figure 1. (a) Transmittance and (b) optical absorption coefficient spectra of vanadium oxide (S_1) and cobalt doped vanadium oxide (S_2 to S_5) thin films.

Figura 1. Espectros de transmitancia (a) y coeficiente de absorción óptica (b) para películas delgadas de óxido de vanadio (S_1) y óxido de vanadio dopado (S_2 to S_5).

Thin films surface morphology

Figure 3 shows AFM three dimensional surface topography images in scales of $2 \text{ m} \times 2 \text{ }\mu\text{m}$ of (a) S_1 , (b) S_2 , (c) S_3 , (d) S_4 and (e) S_5 VO_x : Co^{2+} film samples. The root-mean-square roughness of the same samples is plotted in Figure 3f. The surface topography of pure VO_x film (S_1) presents lumps and the lowest roughness. As the cobalt ions are incorporated into VO_x host, variations in shape and roughness are observed in AFM images. Notable changes are observed in samples S_3 and S_4 that exhibit a ring like morphology and increased roughness (8 - 9 nm) in comparison with S_1 and S_2 (4 - 5 nm) samples. sample S_5 that contains the highest cobalt concentration loses the ring pattern in its surface morphology and shows the highest roughness (~ 23 nm) among the five samples. Similar results are reported elsewhere, suggesting that the inclusion of Co^{2+} in VO_x host by solution methods modifies the superficial morphology of cobalt doped vanadium oxide thin films (Fuentes-Ríos *et al.*, 2021). Such porous morphology encourages potential use of VO_x : Co^{2+} thin films as a cathode material for lithium battery applications (Wang *et al.*, 2011).

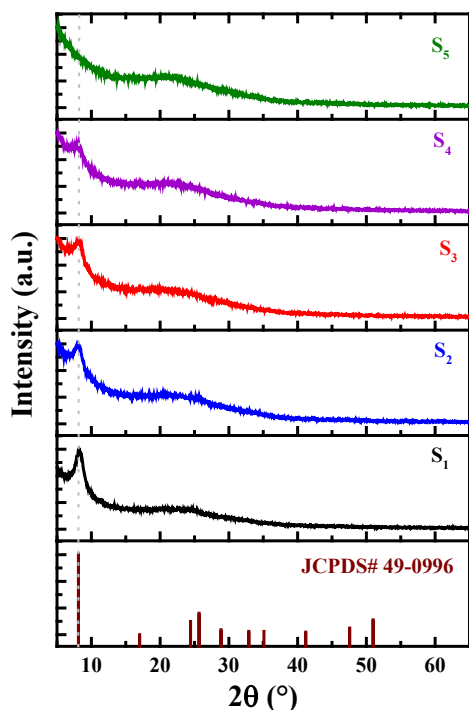


Figure 2. X-ray diffractions patterns of vanadium oxide with different Co²⁺ concentrations.

Figura 2. Patrones de difracción de rayos X de óxido de vanadio con diferentes concentraciones de Co²⁺.

To complement the AFM results, SEM micrographs of S₁, S₃ and S₅ samples were analyzed and are shown in Figure 4. Without cobalt addition, vanadium oxide sample S₁ shows a granular ground with shallow leaves. The S₃ sample (VO_x:Cobalt salt = 50:50), presents an interconnected rings or porous arrangement, very similar to the AFM image of the

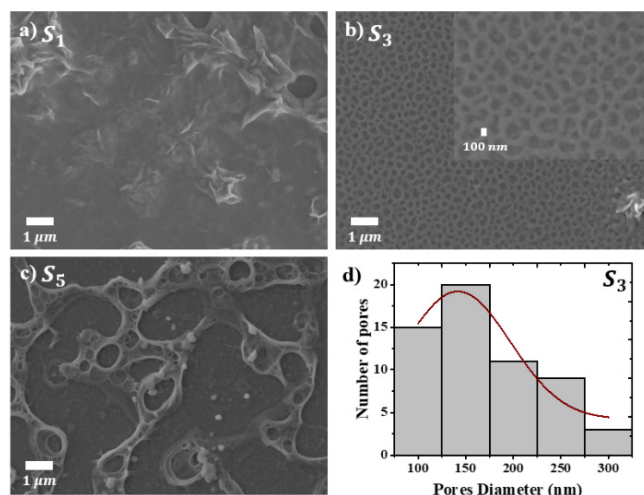


Figure 4. SEM micrographs with different magnifications of a) S₁, b) S₃, c) S₅ and d) histogram of S₃ pores.

Figura 4. micrografías de microscopía electrónica de barrido con diferentes magnificaciones de las muestras a) S1, b) S3, c) S5 y d) histograma de los poros de la muestra S3.

same sample (Fig. 3c). The pore size distribution histogram of this film sample is in Figure 4d. It shows that the pore size varies from 100 to 300 nm, and those with ~150 nm predominates. By chemical element mapping in the SEM image of sample S₃, vanadium and cobalt elements have been detected to have a homogeneous distribution inside the pores. Finally, the sample with the highest concentration of cobalt, S₅, shows an irregular porous granular pattern at the surface, and under such pattern a continuous film is observed.

Chemical composition

To assess the chemical state of the VO_x:Co²⁺ film samples, an accurate peak-fitting analysis of their X-ray photoelectron spectra (XPS) (A. Herera-Gomez, no date) was carried on.

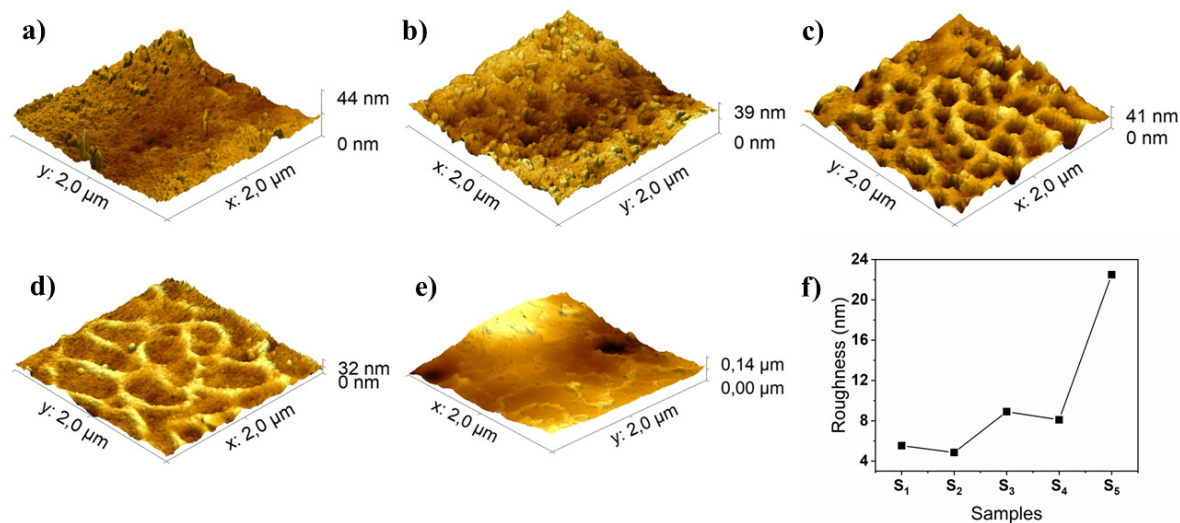


Figure 3. Three-dimensional AFM surface morphology images of (a) S₁, (b) S₂, (c) S₃, (d) S₄, (e) S₅ samples. (f) Roughness values of the same samples.

Figura 3. Imágenes tridimensionales por AFM de la morfología superficial de las muestras (a) S₁, (b) S₂, (c) S₃, (d) S₄ y (e) S₅. (f) Valores de aspereza de las mismas muestras.

Figure 5 shows the photoelectron spectra of the five samples corresponding to the (a) Co 2*p* and (b) O 1*s* and V 2*p* core-levels. From the Co 2*p* spectra (Figure 5a) we observe that the experimental data are congruent to that of the Co²⁺ chemical state, showing the main peak centered at 780.80 eV, but at the same time, three satellite peaks at higher binding energies that are characteristics of the Co²⁺ state (Yang *et al.*, 2010; Biesinger *et al.*, 2011; Martínez-Gil *et al.*, 2020). It is important to mention that the relative intensities of those satellite peaks suggest that there are neighboring atoms arranged in a short-range order, possibly having distortions that deviate from the octahedral Co²⁺ symmetry. That is, the intensities of the satellite peaks are proportional to the molecular defects or amorphous state of the material, which correlates to the amorphous XRD results for all samples.

The V 2*p* and the O 1*s* spectra share the same binding energy range (Figure 5b), where we can observe the sole presence of a vanadium oxide. Due to the large spread of the reported binding energy values of this compound, to assess the present films we have employed the method proposed by Hryha *et al.* (Hryha, Rutqvist and Nyborg, 2012), where instead of using only the energy position of the V 2*p*_{3/2} for che-

mic state determination, we have taken into account the difference in the binding energy between the O 1*s* and the V 2*p*_{3/2} core levels ($\Delta = \text{BE}(\text{O}1s) - \text{BE}(\text{V}2p_{3/2})$). The results show that for all samples the energy separation is around 13.50 eV, which suggests that the oxide obtained with our chemical process is VO₂ (Hryha, Rutqvist and Nyborg, 2012). Here it is interesting to note that the energy position of the V 2*p*_{3/2} in our samples is at 516.50 eV, which is almost the average value of those reported for VO₂ (515.95 eV) and V₂O₅ (517.20 eV), however, due to also the large spread in binding energy calibrations in the literature, we discard the possibility of the V₂O₅ compound.

From peak intensities directly derived from the photoelectron spectra, chemical compositions of our VO₂:Co²⁺ film samples have been determined. We have corrected the peak intensities with the appropriate physical parameters accounting for the photoemission signal attenuation due to scattering (Cabrera-German, Gomez-Sosa and Herrera-Gomez, 2016). The results expressed in terms of atomic percentage for each of the observed chemical species are presented in Figure 6a. Here, we observe that as the Co²⁺ concentration in the precursor solution increases, the amount of Co²⁺ in the

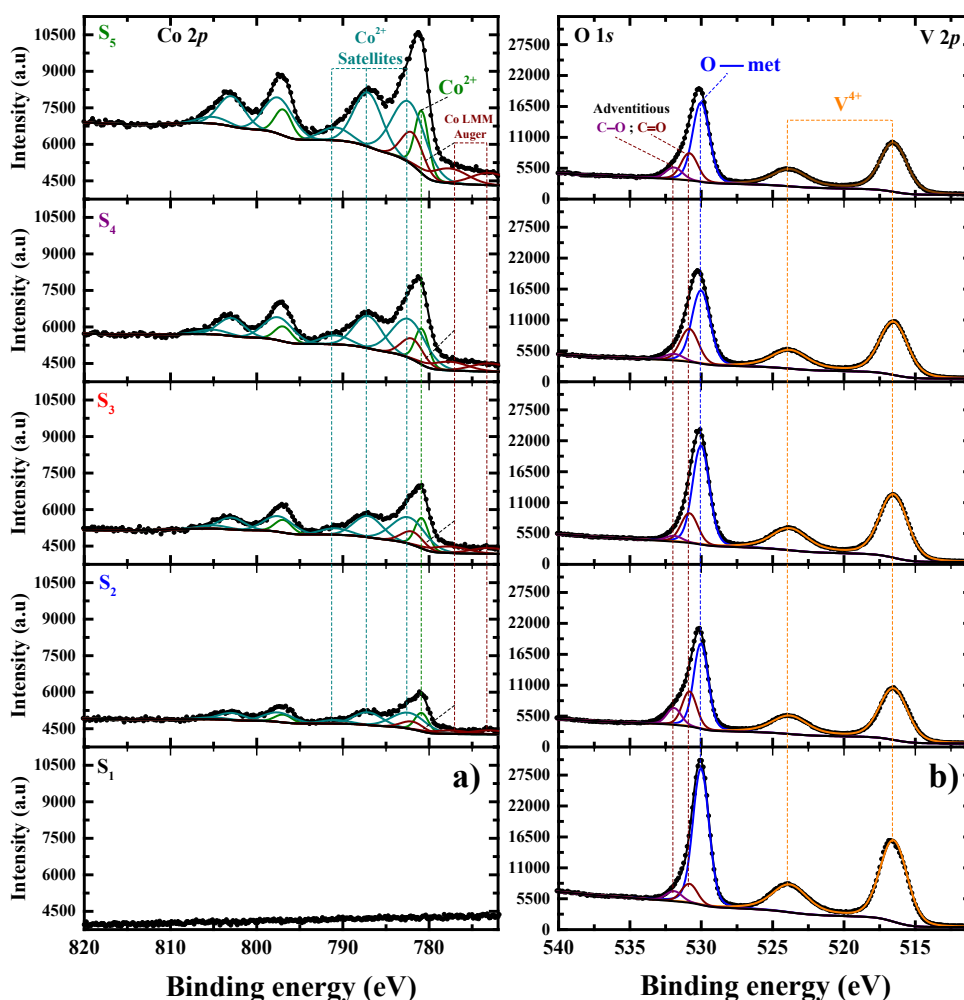


Figure 5. X-ray photoelectron spectra of VO_x:Co²⁺ films with different concentrations of Co²⁺.

Figura 5. Espectro de rayos X de películas de VO_x:Co²⁺ con diferentes concentraciones de Co²⁺.

deposited films also increases, from 0 to 16.55 at %. On the other hand, the V⁴⁺ atomic concentration in all five samples vary slightly, from 31 at % (sample S₁) to 27 at % (sample S₅), which suggests that the VO_x yield is high in all the probed samples. We can also observe that the percentage of oxygen atoms bonded to metals is coherent to the chemical species: VO₂ and CoO, reaching 69 at % for sample S₁ and decreasing up to 56.4 at % for sample S₅ as the Co²⁺ in the films is the largest. The atomic ratio of vanadium versus cobalt (V:Co) in each sample is listed in Table 1, changing from 6.6:1 (S₂), 4.9:1 (S₃), 2.9:1 (S₄) to 1.6:1 (S₅).

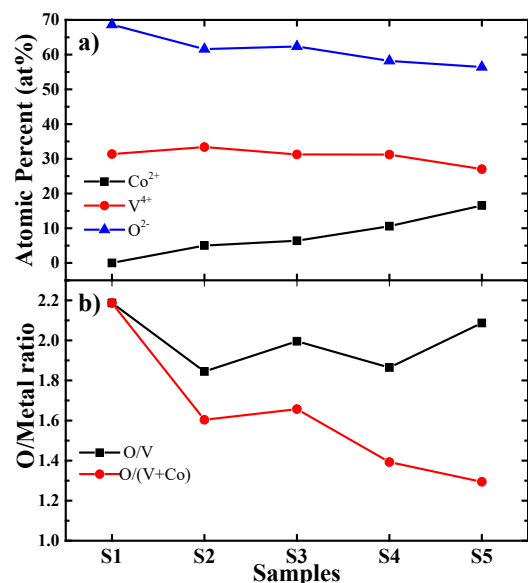


Figure 6. XPS chemical composition assessment: (a) atomic percentage (at%) of elements O, V and Co, and (b) O/V and O/(V+Co) atomic ratios of VO_x:Co²⁺ thin films.

Figura 6. Evaluación de la composición química por XPS: (a) porcentaje atómico (at%) de los elementos O, V y Co, y (b) proporciones atómicas O/V y O/(V+Co) de las películas delgadas de VO_x:Co²⁺.

For a better assessment of metal oxide compositions in the film samples, the ratio between oxygen and metal concentrations is plotted in Figure 6b. Here, the O/V atomic ratio lies around the expected stoichiometry of VO₂ for all the samples, which further confirms our previous analysis. Yet, if we determine the atomic ratio of oxygen to the sum of the two metallic species, O/(V+Co), we observe that such ratio decreases with increasing concentration of Co²⁺ in the reaction solution, a trend that follows the expected stoichiometry of the CoO compound.

CONCLUSIONS

We demonstrate that amorphous thin films of cobalt doped vanadium dioxide can be prepared from spin-coating with a simple solution method without using any ligand or surfactant. Optical band gaps of those films are of ~2.3 eV, with higher absorption coefficients for cobalt doped samples. From detailed quantitative photoelectron analysis, we conclude that there is only one oxidation state of vanadium in all the

film samples, V⁴⁺, giving predominantly VO₂ products. The formation of cobalt oxide is also confirmed by XPS, showing a Co²⁺ oxidation state corresponding to possibly disordered oxygen atoms in an octahedral, correlates to the amorphous nature of the films. Furthermore, the surface morphology of the VO₂:Co²⁺ thin films is largely influenced by the cobalt concentration, giving interconnected circle pore network when the V:Co atomic ratio is around 4.9:1. The wide band gap properties with porous surface structure make these semiconductor thin films promising for cathode material in lithium battery applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the technical assistance of M.L. Ramon-Garcia for XRD measurements, R. Moran-Elvira for SEM analysis, G. Casarrubias-Segura for AFM analysis, and M.R. Banda in XPS data acquisition. The project USO316007880 from División de Ingeniería at the University of Sonora is also recognize. Francisco Hernandez Guzman gratefully acknowledges PRODEP grant with the scholarship No. 511-6/2019-13924.

REFERENCES

- A. Herera-Gomez (no date) *AAnalyzer a peak-fitting program for photoemission data*. Available at: <http://rdataa.com/aanalyzer/aanaHome.htm> (Accessed: 18 April 2020).
- Bae, J. W., Koo, B. R. and Ahn, H. J. (2019) 'Fe doping effect of vanadium oxide films for enhanced switching electrochromic performances', *Ceramics International*, 45(6), pp. 7137–7142. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.12.219.
- Biesinger, M. C. *et al.* (2011) 'Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni', *Applied Surface Science*, 257(7), pp. 2717–2730. doi: 10.1016/j.apsusc.2010.10.051.
- Cabrera-German, D., Gomez-Sosa, G. and Herrera-Gomez, A. (2016) 'Accurate peak fitting and subsequent quantitative composition analysis of the spectrum of Co 2p obtained with Al K α radiation: I: cobalt spinel', *Surface and Interface Analysis*, 48(5), pp. 252–256. doi: 10.1002/sia.5933.
- Channu, V. S. R. *et al.* (2011) 'Electrochemical properties of polyaniline-modified sodium vanadate nanomaterials', *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 104(2), pp. 707–711. doi: 10.1007/s00339-011-6325-0.
- Fuentes-Ríos, J. L. *et al.* (2021) 'Modulation of the Pb/Sn ratio in Pb1-xSnxS thin films synthesized by chemical solution deposition', *Materials Science in Semiconductor Processing*, 136(July). doi: 10.1016/j.mssp.2021.106126.
- Geng, X. *et al.* (2022) 'Tuning Phase Transition and Thermochemical Properties of Vanadium Dioxide Thin Films via Cobalt Doping', *ACS Applied Materials and Interfaces*. doi: 10.1021/acsmi.2c03113.
- Hajzeri, M. *et al.* (2012) 'Sol-gel vanadium oxide thin films for a flexible electronically conductive polymeric substrate', *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 99, pp. 62–72. doi: 10.1016/j.solmat.2011.03.041.
- Ho, H. C. *et al.* (2019) 'High quality thermochromic VO₂ films prepared by magnetron sputtering using V2O5 target with in situ annealing', *Applied Surface Science*, 495(July), p. 143436. doi: 10.1016/j.apsusc.2019.07.178.

- Hryha, E., Rutqvist, E. and Nyborg, L. (2012) 'Stoichiometric vanadium oxides studied by XPS', *Surface and Interface Analysis*, 44(8), pp. 1022–1025. doi: 10.1002/sia.3844.
- Hu, F. *et al.* (2017) 'Synthesis and electrochemical performance of NaV₆O₁₅ microflowers for lithium and sodium ion batteries', *RSC Advances*, 7(47), pp. 29481–29488. doi: 10.1039/c7ra04388k.
- Ji, C. *et al.* (2018) 'High thermochromic performance of Fe/Mg co-doped VO₂ thin films for smart window applications', *Journal of Materials Chemistry C*, 6(24), pp. 6502–6509. doi: 10.1039/c8tc01111g.
- Khatibani, A. B., Abbasi, M. and Rozati, S. M. (2016) 'Peculiarities of deposition times on gas sensing behaviour of vanadium oxide thin films', *Acta Physica Polonica A*, 129(6), pp. 1245–1251. doi: 10.12693/APhysPolA.129.1245.
- Li, B. *et al.* (2019) 'Tungsten doped M-phase VO₂ mesoporous nanocrystals with enhanced comprehensive thermochromic properties for smart windows', *Ceramics International*, 45(4), pp. 4342–4350. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.11.109.
- Liu, S. *et al.* (2020) 'One-step microwave-controlled synthesis of CoV₂O₆·2H₂O nanosheet for super long cycle-life battery-type supercapacitor', *Electrochimica Acta*, 364, p. 137320. doi: 10.1016/j.electacta.2020.137320.
- Lu, C. *et al.* (2019) 'Terahertz Transmittance of Cobalt-Doped VO₂ Thin Film: Investigated by Terahertz Spectroscopy and Effective Medium Theory', *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 9(2), pp. 177–185. doi: 10.1109/THZ.2019.2894516.
- Mane, A. A. and Moholkar, A. V. (2017) 'Effect of film thickness on NO₂ gas sensing properties of sprayed orthorhombic nanocrystalline V₂O₅ thin films', *Applied Surface Science*, 416(2), pp. 511–520. doi: 10.1016/j.apsusc.2017.04.097.
- Martinez-Gil, M. *et al.* (2020) 'Effect of annealing temperature on the thermal transformation to cobalt oxide of thin films obtained via chemical solution deposition', *Materials Science in Semiconductor Processing*, 107(October 2019). doi: 10.1016/j.mssp.2019.104825.
- Peng, B. *et al.* (2018) 'Transparent AlON ceramic combined with VO₂ thin film for infrared and terahertz smart window', *Ceramics International*, 44(12), pp. 13674–13680. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.04.205.
- Petnikota, S. *et al.* (2018) 'Amorphous Vanadium Oxide Thin Films as Stable Performing Cathodes of Lithium and Sodium-Ion Batteries', *Nanoscale Research Letters*, 13, pp. 1–13. doi: 10.1186/s11671-018-2766-0.
- Sharma, G. P. *et al.* (2021) 'Chalcogenide Dopant-Induced Lattice Expansion in Cobalt Vanadium Oxide Nanosheets for Enhanced Supercapacitor Performance', *ACS Applied Energy Materials*, 4(5), pp. 4758–4771. doi: 10.1021/acsaem.1c00357.
- Shen, N. *et al.* (2021) 'Vanadium dioxide for thermochromic smart windows in ambient conditions', *Materials Today Energy*, 21, p. 100827. doi: 10.1016/j.mtener.2021.100827.
- Silversmit, G. *et al.* (2004) 'Determination of the V2p XPS binding energies for different vanadium oxidation states (V⁵⁺ to V⁰⁺)', *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 135(2–3), pp. 167–175. doi: 10.1016/j.elspec.2004.03.004.
- Silversmit, G. *et al.* (2006) 'An XPS study on the surface reduction of V₂O₅(0 0 1) induced by Ar⁺ ion bombardment', *Surface Science*, 600(17), pp. 3512–3517. doi: 10.1016/j.susc.2006.07.006.
- Tabatabai Yazdi, S., Pilevar Shahri, R. and Shafei, S. (2021) 'First synthesis of In-doped vanadium pentoxide thin films and their structural, optical and electrical characterization', *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 263(August 2020), p. 114755. doi: 10.1016/j.mseb.2020.114755.
- Wang, S. *et al.* (2011) 'Three-dimensional porous V₂O₅ cathode with ultra high rate capability', *Energy and Environmental Science*, 4(8), pp. 2854–2857. doi: 10.1039/c1ee01172c.
- Wang, S. *et al.* (2020) 'Facile synthesis of VO₂(D) and its transformation to VO₂(M) with enhanced thermochromic properties for smart windows', *Ceramics International*, 46(10), pp. 14739–14746. doi: 10.1016/j.ceramint.2020.02.278.
- Xu, Y. *et al.* (2019) 'Ammonium Vanadium Bronze as a Potassium-Ion Battery Cathode with High Rate Capability and Cyclability', *Small Methods*, 3(8), pp. 1–9. doi: 10.1002/smt.201800349.
- Yang, J. *et al.* (2010) 'Synthesis and characterization of Cobalt hydroxide, cobalt oxyhydroxide, and cobalt oxide nanodiscs', *Journal of Physical Chemistry C*, 114(1), pp. 111–119. doi: 10.1021/jp908548f.
- Yao, X. *et al.* (2018) 'Cesium-Doped Vanadium Oxide as the Hole Extraction Layer for Efficient Perovskite Solar Cells', *ACS Omega*, 3(1), pp. 1117–1125. doi: 10.1021/acsomega.7b01944.
- Yuan, L. *et al.* (2021) 'In-Situ thermochromic mechanism of Spin-Coated VO₂ film', *Applied Surface Science*, 564(June), p. 150441. doi: 10.1016/j.apsusc.2021.150441.
- Zhan, Y. *et al.* (2020) 'Tuning thermochromic performance of VO_x-based multilayer films by controlling annealing pressure', *Ceramics International*, 46(2), pp. 2079–2085. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.09.188.
- Zhou, X. *et al.* (2020) 'Abnormal dependence of microstructures and electrical properties of Y-doped VO₂ thin films on deposition temperature', *Ceramics International*, 46(11), pp. 18315–18321. doi: 10.1016/j.ceramint.2020.05.053.



Actividad antifúngica del aceite esencial y extracto acuoso del orégano *Lippia palmeri* W. sobre *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp.

Antifungal activity of the essential oil and aqueous extract of oregano *Lippia palmeri* W. on *Fusarium oxysporum* and *Thanatephorus* sp.

Genesis Valenzuela-Quintero*¹, María Magdalena Ortega-Nieblast¹, María Guadalupe Burboa-Zazueta¹, Luis Enrique Gutiérrez-Millán¹, Juan Pedro López-Córdova², María Eugenia Rentería-Martínez², José Jiménez-León², Gilberto Curlango-Rivera³ y José Cosme Guerrero-Ruíz²

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Avenida Luis Donaldo Colosio s/n Edificio 7G, Centro, C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México; correo-e: genesis.valqu12@gmail.com, maria.burboa@unison.mx, luis.millan@unison.mx

² Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Carretera 100 a Bahía de Kino km. 21.5, Hermosillo, Sonora, México; correo-e: pedro.lopez@unison.mx, eugenia.renteria@unison.mx, jose.jimenez@unison.mx, cos-meguerrero@hotmail.com

³ Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, C.P. 22860, Ensenada, Baja California, México; correo-e: curlango@arizona.edu

RESUMEN

En los últimos años en la agricultura ha existido una creciente necesidad de disminuir y sustituir el uso de químicos sintéticos por la aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales en los cultivos para el control de fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto del aceite esencial y extracto acuoso de la especie vegetal *Lippia palmeri* W. colectada en Sonora, México. La actividad antifúngica se realizó mediante el método de difusión en agar sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las dosis de aceite esencial 0, 100, 150, 200, 250 y 300 µL/mL y del extracto acuoso liofilizado 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 g, el cual fue evaluado mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posterior comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). El aceite esencial y el carvacrol de *Lippia palmeri* W. lograron inhibir al 100 % el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a diferencia de *Thanatephorus* sp. que obtuvo entre 90 y 100 %. El extracto acuoso inhibió según la dosis aplicada a *F. oxysporum* entre el 20 y 100 % y para *Thanatephorus* sp. fue de 10 a 100 %.

Palabras claves: *Fusarium oxysporum*, *Thanatephorus* sp., *Lippia palmeri* W., orégano, antifúngico.

ABSTRACT

In recent years there has been a growing need in agriculture to reduce and replace the use of synthetic chemicals with the application of plant extracts and essential oils in crops for the control of phytopathogens. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* effect of the essential oil and aqueous extract of the plant species *Lippia palmeri* W. collected in the state of Sonora, Mexico. The antifungal activity was determined by the agar diffusion method on the *Fusarium oxysporum* and *Thanatephorus* sp. phytopathogenic fungi. The percentage of inhibition of mycelial growth of the dose

*Autor para correspondencia: Genesis Valenzuela Quintero

Correo electrónico: genesis.valqu12@gmail.com

Recibido: 2 de diciembre de 2022

Aceptado: 8 de marzo de 2023

of essential oil 0, 100, 150, 200, 250 and 300 µL/mL and of the lyophilized aqueous extract 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30 g will be decreased, which was evaluated through an analysis of variance (ANOVA) and its subsequent Tukey comparison of means ($p \leq 0.05$). The essential oil and carvacrol of *Lippia palmeri* W. managed to inhibit 100 % of the growth of *Fusarium oxysporum*, unlike *Thanatephorus* sp., which obtained between 90 and 100 %. Depending on the dose applied, the aqueous extract inhibited *F. oxysporum* between 20 and 100 % and *Thanatephorus* sp. it was from 10 to 100 %.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Thanatephorus* sp., *Lippia palmeri*, oregano, antifungi.

INTRODUCCIÓN

En ambientes propicios, los hongos fitopatógenos del suelo pueden traer consigo pérdidas económicas catastróficas al atacar entre el 60 % y 100 % de la superficie de siembra (Rivera, 2009), estos se localizan naturalmente en suelos agrícolas, pueden encontrarse una o diversas especies, provocando podredumbre en las raíces y cuello de las plantas, lo que puede afectar al productor al hacer un diagnóstico incorrecto (Fernández-Herrera *et al.*, 2013).

Fusarium oxysporum y *Thanatephorus cucumeris* (Anamorfo: *Rhizoctonia solani*) son hongos que afectan a diversos cultivos alrededor del mundo y tienen una gran cantidad de hospederos incluyendo plantas silvestres, cultivos y malezas (Ajayi-Oyetunde y Bradley, 2018; CABI, 2020). En el estado de Sonora se ha registrado la presencia de los hongos *F. oxysporum* y *T. cucumeris* en cultivos importantes para la región, como lo son el chile, tomate, garbanzo, sandía, melón, papa y vid, entre otros (Padilla *et al.*, 2006; Silva-Rojas *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2012; Meza-Möller *et al.*, 2014).

En las últimas décadas los fungicidas más utilizados en agricultura, para el control de enfermedades originadas por hongos generalmente, se clasifican dentro de los siguientes

grupos: fosforados, clorados, carbamatos, nitroderivados y derivados aromáticos, que tienen acción protectora y de prevención (Almandoz *et al.*, 2000; Martínez-Romero *et al.*, 2008; Cantrell *et al.*, 2012; Murillo *et al.*, 2013). El impacto negativo que estos fungicidas han tenido para la naturaleza y para el consumidor, han forzado a la comunidad científica a buscar y proponer nuevas alternativas naturales y libres de residuos tóxicos (Sayuri *et al.*, 2018). Siempre y cuando sustituyan los fungicidas químicos sintéticos con el uso de aceites esenciales para inhibir cualquier tipo de organismo fitopatógenos (Silva-Marrufo y Marín-Tinoco, 2021; Marín-Tinoco *et al.*, 2021), como se planteó en esta investigación.

La naturaleza química de los aceites esenciales y extractos acuosos los hacen ser una excelente alternativa como biocontroladores de fitopatógenos; éstos son extraídos de las plantas por diferentes procesos y pueden tener entre 50 y 300 compuestos químicos, de los cuales uno o dos serán los de mayor porcentaje en la composición. Los aceites esenciales están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, además de sustancias azufradas y nitrogenadas; por su parte, los extractos acuosos están compuestos principalmente por alcaloides, taninos, quinonas, cumarinas, compuestos fenólicos y fitoalexinas (Stashenko, 2009; Ruíz *et al.*, 2015; Wangkhem *et al.*, 2019).

Recientemente, Romero-Bastidas *et al.* (2020) han aplicado el extracto etanólico de orégano en semillas de garbanzo, como inhibidor de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, obteniendo resultados positivos al concluir que *L. palmeri* puede ser una alternativa natural para el control eficaz de los agentes mencionados anteriormente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y extracto acuoso de orégano *Lippia palmeri* W. sobre los hongos patógenos *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp. de manera *in vitro*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de las plantas de orégano (*Lippia palmeri* Watson), se colectaron en la época de floración en el mes de septiembre, en el campo experimental del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, localizado en el km. 21 de la carretera Hermosillo a Bahía de Kino, Sonora, México (29.01595217894536, -111.13341050793869).

Extracción del aceite esencial y extracto acuoso

Se establecieron dos tipos de bioensayos, uno para aceite esencial y otro para el extracto acuoso. Para ambos bioensayos se dejaron secando las hojas de cada una de las plantas de orégano colectadas a temperatura ambiente y a la sombra, una vez que el material vegetal fue secado las hojas se almacenaron en bolsas de papel.

Para realizar la extracción del aceite esencial se siguió el método de arrastre al vapor utilizando 100 g de hojas de *L. palmeri* durante 4 h con ayuda de un equipo Clevenger (Winzer®, USA). El aceite esencial fue separado de la fase acuosa por medio de decantación y posteriormente se le agregó

sulfato de sodio anhidro para eliminar la humedad del aceite esencial; ya extraído el aceite esencial se conservó en viales ámbar a -4 °C.

Para el extracto acuoso se pesaron 70 g de hoja seca, se colocaron en un vaso de precipitado con agua destilada y se agitó durante 24 h; posteriormente se filtró por gravedad y el filtrado fue liofilizado en un equipo (LABCONCO FreeZone, USA). El extracto acuoso restante no liofilizado fue conservado a -4 °C.

Análisis de cromatografía de gases/masas del aceite esencial y el extracto acuoso de orégano cultivado (*Lippia palmeri* W.)

La identificación y cuantificación de los compuestos que forman el aceite esencial y extracto acuoso se determinaron utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890, USA) acoplado a un espectrómetro de masas, cuadrupolo simple (Agilent 5975C, USA), con una fuente de ionización de impacto electrónico a 70 eV. Se utilizó una columna capilar HP-5MS UI de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película, usando helio como gas portador, con un flujo de 1 mL/min. El modo de inyección fue en modo split en una relación de 100:1; el volumen de inyección fue de 1 µL; el aceite esencial y extracto acuoso liofilizado se diluyeron en una proporción 1:50, con metanol grado HPLC ≥ 99.9 %. Las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 150 °C y 200 °C respectivamente. El programa de temperatura inició a 50 °C por 5 min, seguidos de una rampa de calentamiento a razón de 8 °C/min hasta 300 °C, manteniendo esta temperatura por 5 min; el tiempo total de corrida fue de 41.25 min. La adquisición de los datos se llevó a cabo en modo *scan* en un rango de masas de 40 - 450 m/z. En el software de análisis de datos MSD ChemStation E.02.02.1431; la identificación de los compuestos se llevó a cabo por su espectro de masas utilizando el programa 5975TAD Data Analysis vinculado a la Librería NIST 2011.

Bioensayo de la actividad de aceites esencial y el extracto acuoso del orégano

Se utilizaron los aislados registrados en el GenBank, FONRB01 con número de acceso MW712740 de *Fusarium oxysporum* y el aislado GVQO1 con número de acceso MZ683160 de *Thanatephorus* sp., los cuales fueron aislados e identificados en el Laboratorio de Biología Molecular y el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

Siguiendo la metodología utilizada por Barrera-Necha *et al.* (2008) los aceites esenciales y sus compuestos fueron disueltos con ayuda de tween 20, se mezclaron por medio de agitación en matraces con 250 mL de medio de cultivo PDA esterilizado; las dosis utilizadas de aceite esencial, previamente solubilizado en DMSO (dimetil-sulfóxido), fueron: 0, 100, 150, 200, 250 y 300 µL/mL, utilizando al compuesto timol en dosis de 100 y 300 µL/mL como control positivo y el propio medio PDA como control negativo. Para el extracto acuoso liofilizado se añadieron los polvos vegetales del orégano al

PDA en dosis de 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 g, también para el extracto acuoso se utilizaron el timol y el PDA como controles; las diferentes concentraciones y sus controles se vaciaron en cajas Petri de 90 x 14 mm. Un disco de agar de 7.5 mm del cultivo del patógeno se colocó en el centro de cada caja con los tratamientos; todas las cajas Petri con tratamiento, se pasaron a una incubadora a 27 °C por 7 d para *Thanatephorus* sp. y 13 d para *F. oxysporum*. El crecimiento del micelio o diámetro de la colonia fue medido de forma diaria utilizando un vernier. Con los datos de diámetro de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al tratamiento testigo (C.M.R.T.) mediante la fórmula (Barrera-Necha, 2009):

$$\text{C.M.R.T. (\%)} = (\text{TCT-TcT/TCT}) \times 100$$

Donde: TCT = tasa de crecimiento en el testigo y TcT = tasa de crecimiento del tratamiento.

Análisis estadístico

El diseño fue de bloques completamente al azar. Los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fueron transformados con la raíz cuadrada de arcoseno y evaluados mediante un análisis de varianza de una vía de clasificación. Posteriormente se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey, usando el paquete estadístico JMP versión 5.0.1 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite esencial del orégano cultivado presentó 38 compuestos. El componente que se encontró con mayor abundancia fue timol (32 %), seguido por cariofileno (21.7 %) que en conjunto constituyen el 53.7 % del total. Otros compuestos abundantes fueron carvacrol y o-cimeno (ambos 5.56 %), γ -terpineno (5.00 %), óxido de cariofileno (4.32 %), 4-tert-butylcatechol (2.47 %), 3-tert-butyl-4-metoxifenol (1.84 %), α -cariofileno (1.75 %), β -mirceno (1.36 %) y acetato de timol (1.31 %). El 22.69 % restante lo conformaron 26 compuestos que su contenido es en trazas desde 1.19 al 0.01 %. Estos resultados fueron comparados con el estudio realizado Ortega-Nieblas *et al.* (2011) en el que determinaron los componentes de *Lippia palmeri* proveniente de dos localidades silvestres ubicadas en Álamos y del Puerto del Orégano, Sonora; el del presente estudio mostró similitud en la presencia de compuestos con ambos aceites: α -pineno, α -felandreno, α -terpineno, o-cimeno, γ -terpineno, borneol, timol, carvacrol, cariofileno, alo-aromadendreno, β -bisaboleno, espatulenol. Algunos autores, concuerdan que los que contienen carvacrol, timol y o-cimeno, son los responsables de actividad insecticida, bactericida, fungicida y antiviral (Aligiannis *et al.*, 2001; Salgueiro, 2003; Radudiene, 2005; Camilo *et al.*, 2007; Bothelo *et al.*, 2007). Generalmente los estudios que se relacionan con la composición del aceite de orégano son enfocados en el *Origanum vulgare*, demostrando que el rendimiento y composición de estos se relacionan directamente con el estrés ambiental al que esté sometida la planta, su geolocalización y del método de extracción utilizada (Ávila *et al.*, 2010).

El cromatograma del extracto acusó del orégano cultivado, identificó 42 compuestos. El compuesto de porcentaje mayoritario fue timol (12.56 %), seguido del o-cimeno (11.58 %), furfural (9.25 %) y levoglucosano (5.49 %), conformando estos cuatro compuestos el 38.8 % del total. El resto fueron 38 compuestos con concentraciones bajas, entre los que se encuentra el ribotol (1.91 %), dimetil melato (1.67 %) y el ácido benzoico (1.52 %), conocidos por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Al igual que en el aceite esencial del orégano, en el extracto acuoso se encontraron compuestos que están registrados en la literatura con actividad biológica importante.

Actividad biológica de los aceites esenciales sobre *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp.

Se establecieron las dosis del aceite esencial para inhibir a *F. oxysporum* y *Thanatephorus* sp. En los resultados obtenidos para *F. oxysporum* no se observaron diferencias significativas entre las dosis utilizadas ($p \leq 0.05$). Se obtuvieron resultados relevantes en los 5 tratamientos de aceite esencial del orégano al igual que con el carvacrol como control positivo, mostrando una fuerte actividad biológica en contra del hongo, al obtener una inhibición total e impedir el crecimiento micelial en cualquiera de sus dosis aplicadas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Wogiatzi *et al.* (2009) quienes encontraron que los biotipos de *O. vulgare* ricos en timol y carvacrol inhibieron satisfactoriamente el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Los resultados encontrados en nuestra investigación son de gran relevancia, considerando la importancia de encontrar alternativas naturales para erradicar a *F. oxysporum*, ya que éste se encuentra entre los hongos fitopatógenos más importantes a nivel mundial por los daños causados en cultivos y que además puede afectar la salud humana (Dean *et al.*, 2012)

Para *Thanatephorus* sp. la dosis de 100 $\mu\text{L/mL}$ fue la que tuvo menor efecto de inhibición entre 90 y 93 %, pero a medida que se iba incrementado la dosis de aceite esencial, este tenía un control *in vitro* hasta llegar a un 99 y 100 % de inhibición en el transcurso de los 7 d (Figura 1), se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos de 100 y 150 $\mu\text{L/mL}$ respecto a los demás. Con la tendencia en la baja del crecimiento micelial nos indica que a mayor cantidad de aceite esencial se tiene una mayor sensibilidad por parte de *Thanatephorus* sp. al tener una inhibición total en el crecimiento del micelio. Siramon *et al.* (2013) trabajaron de forma *in vitro* con el aceite esencial de eucalipto rojo contra *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Thanatephorus cucumeris* y *Rhizopus oryzae*, este aceite esencial tuvo una inhibición inducida de entre el 84 y 100 % para *F. oxysporum* y *T. cucumeris*.

Actividad biológica de los extractos acuosos sobre *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp.

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los tratamientos aplicados para la inhibición de *F. oxysporum* utilizando extracto acuoso del orégano, las dosis con mejor

resultado de 0.25 g y 0.30 g con una inhibición entre el 60 % y 90 % las dosis más bajas que fueron de 0.10 a 0.15 g inhibieron entre el 20 % y 60 % el crecimiento micelial (Figura 2); en otros estudios se han experimentado con extractos acuosos evaluando el potencial antifúngico, Jawadayn-Talib *et al.* (2020) probaron diferentes partes de hojas y raíces de *Chenopodium album* sobre *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotinia sclerotium*, utilizando las concentraciones de 0, 5, 10 y 15 % de extracto de acuoso de hojas y raíces, concluyendo que este tenía una reducción significativa del crecimiento del micelio de hongos teniendo una inhibición entre el 15 y 100 %.

Al igual que con *F. oxysporum* se utilizó el extracto acuoso de *L. palmeri* para inhibir a *Thanatephorus* sp. (Figura 3) se pudo observar que en las primeras 24 h, fue cuando las dosis tuvieron mejor respuesta. La dosis de 0.30 g tuvo una inhibición entre 58 y 100 %, mientras que las dosis más bajas de 0.10 y 0.15 g inhibieron entre 10 y 38 % existiendo diferencias significativas entre los tratamientos, los controles positivos y negativo. Se ha experimentado con extractos metanólicos de *L. tridentata* y *Flourensia cernua* sobre *R. solani* donde se inhibió entre el 100 % y 85 % respectivamente indicando que sí es posible controlar el desarrollo de hongos fitopatógenos con extractos vegetales (López-Benítez, 2005; Rodríguez-Castro *et al.*, 2020).

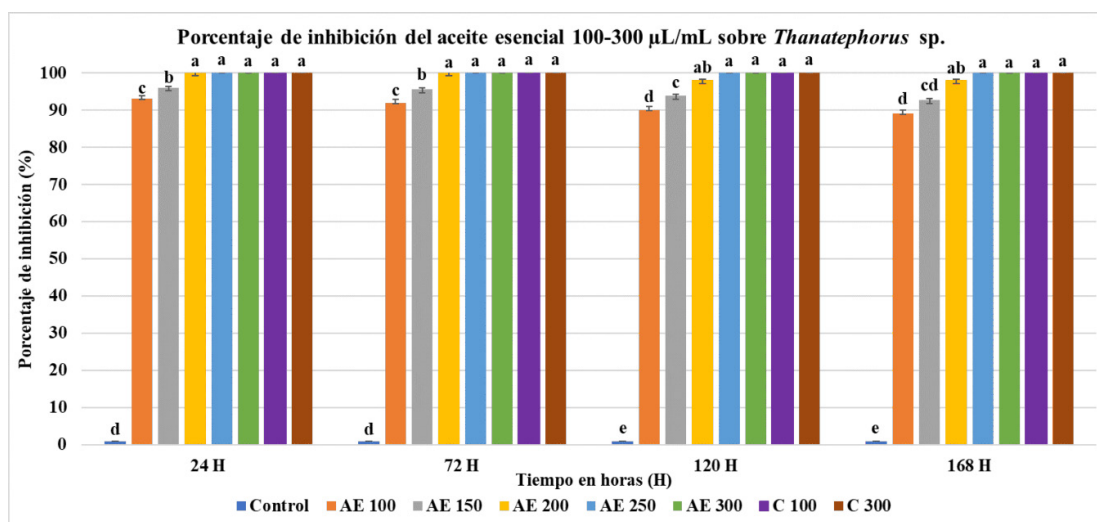


Figura 1. Actividad antifúngica del aceite esencial de *L. palmeri* en dosis de 100, 150, 200, 250 y 300 µL/mL; como control positivo carvacrol 100 y 300 µL/mL, expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Thanatephorus* sp. prueba de medias entre las diferentes concentraciones ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Antifungal activity of the essential oil of *L. palmeri* at dose of 100, 150, 200, 250 and 300 µL/mL; as a positive control Carvacrol 100 and 300 µL/mL expressed as a percentage of inhibition of the growth of the fungus *Thanatephorus* sp. test of means between the different concentrations ($p \leq 0.05$).

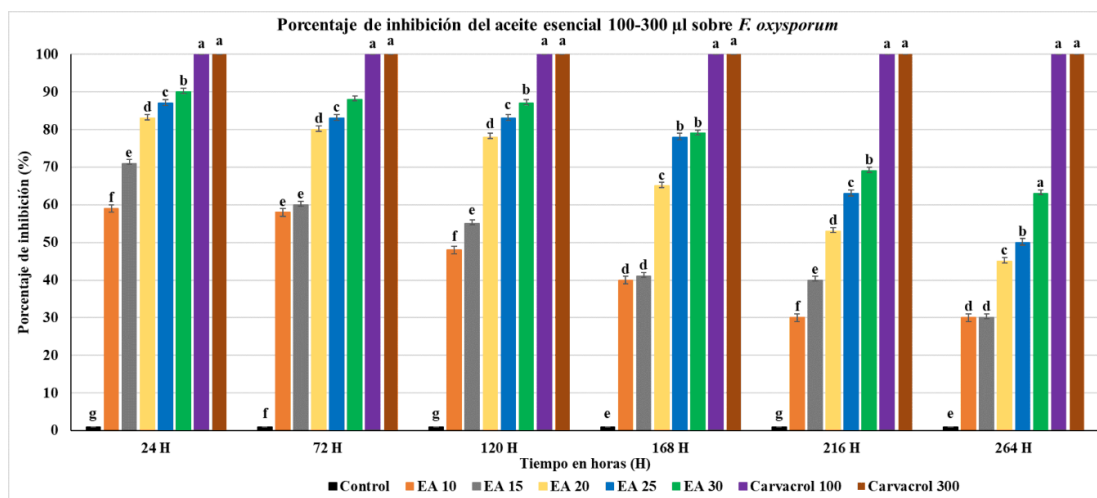


Figura 2. Actividad antifúngica del extracto acuoso liofilizado de *L. palmeri* en dosis de 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 g en 250 mL de PDA; como control positivo carvacrol 100 y 300 µL/mL expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *F. oxysporum*. prueba de medias entre las diferentes concentraciones ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Antifungal activity of the lyophilized aqueous extract of *L. palmeri* at dose of 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 and 0.30 g in 250 mL PDA; as a positive control Carvacrol 100 and 300 µL/mL expressed as a percentage of inhibition of the growth of the fungus *F. oxysporum*. test of means between the different concentrations ($p \leq 0.05$).

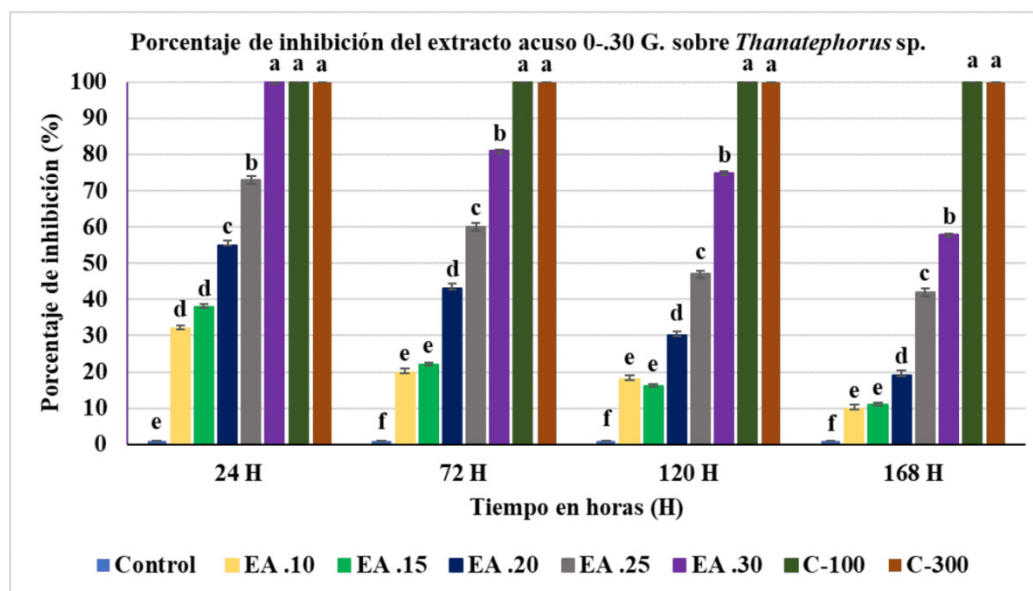


Figura 3. Actividad antifúngica del extracto acuoso liofilizado de *L. palmeri* en dosis de 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 g en 250 mL PDA, expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Thanatephorus* sp. Prueba de medias entre las diferentes concentraciones ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Antifungal activity of the lyophilized aqueous extract of *L. palmeri* at concentrations of 0.10, 0.15, 0.20, .025 and 0.30 g in 250 mL PDA, expressed as a percentage of inhibition of the growth of the fungus *Thanatephorus* sp. test of means between the different concentrations ($p \leq 0.05$).

En diversas investigaciones se le atribuye el efecto antifúngico al terpeno timol y a su isómero el carvacrol que se encuentran en los aceites esenciales y extractos acuosos en especies como *O. vulgare*, *L. alba*, *L. berlandieri* y *L. graveolens*. Se ha reportado que estos compuestos pueden afectar al hongo al alterar su estructura morfológica, retrasando y reduciendo el desarrollo al producir lisis entre la membrana y pared celular del hongo (Kordal *et al.*, 2008). Al tener contacto la membrana con el aceite esencial se da una pérdida de la integridad de la membrana y una disminución en la cantidad de ergosterol compuesto principal que forma la membrana de los hongos, así como una respuesta inhibitoria a la formación de la pared (Shreaz, 2016). Por último, igualmente se ha señalado que la expresión de algunos genes pudiera verse afectada de forma negativa, especialmente, aquéllos involucrados en los procesos de la adhesión, desarrollo, dimorfismo y la reproducción de esporas del hongo (D'agostino, 2019).

4. CONCLUSIONES

La cromatografía de gases/masas permitió caracterizar químicamente al aceite esencial y el extracto acuoso a partir de hojas de *Lippia palmeri* W, y evaluar su efecto antifúngico *in vitro*, contra hongos de importancia agrícola a nivel mundial. Los resultados evidenciaron que las dos especies de fitopatógenos *F. oxysporum* y *Thanatephorus* sp. fueron inhibidos *in vitro* por el aceite esencial y extracto acuoso del orégano *L. palmeri* W., la velocidad de crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp. se redujo acorde al aumento de las concentraciones utilizadas. La actividad biológica de *L. palmeri* puede jugar un importante papel actuando como bioplaguicida contra hongos fitopatógenos que habitan en

el suelo gracias a sus componentes identificados tales como: timol, carvacrol, cariofileno y o-cimeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Fusarium oxysporum strain RB001 was kindly provided by Dr. Irene Ileana Ramirez Bustos.

6. REFERENCIAS

- Aliγιannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. y Chinou, I. 2001. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4168-4170. DOI: 10.1021/jf001494m
- Alkoorenee, J. T., Al-khshemawee, H. H., Kadhim Al-badri, M. A., Al-srai, M. S. y Daweri, H. H. 2020. Antifungal activity and GC-MS detection of leaves and roots parts of *Chenopodium album* extract against some phytopathogenic fungi. *Indian Journal of Agricultural Research*. 54: 117-121. DOI: 10.18805/IJARE.A-433
- Almandoz, J.E., Pico, V., Pérez, L., Rodríguez, F. y Parra, J. 2000. Efectividad de nuevos fungicidas para el control de *Alternaria solani* Ellis y Martin en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). La Habana.
- Barrera-Necha, L. L. y García-Barrera, L. J. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica UDO Agrícola*. 8(1): 33-41. ISSN-e 1317-9152
- Camilo, D.E, Luz, A.M, Martínez, J.R. y Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Técnica*. 3: 435-438. ISSN: 0122-1701

- Cantrell, C.L., Dayan, F.E. y Duke, S.O. 2012. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*. 75(6): 1231-1242. DOI: 10.1021/np300024u
- Corella-Bernal, R.A., Ortega-Nieblas, M.M., Robles-Burgueño, M.R., Borboa-Flores J. y McCaughey-Espinoza, D. 2008. El cultivo de orégano *Lippia palmeri* Watson, en el estado de Sonora. 3era. Reunión Nacional sobre el Orégano, 22 al 24 de agosto; Saitillo, Coah., México.
- D'agostino, M., Tesse, N., Frippiat, J.P., Machouart, M. y Debourgogne, A. 2019. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules*. 24(20): 3713. DOI:10.3390/molecules24203713
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D. y Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(4): 414-430. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Fernández-Herrera, E., Uribe-Rivera, S.E., Guerrero-Ruiz, J.C., y Rueda-Puente, E.O. 2013. Hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de raíz y cuello en sandía en la costa de Hermosillo, Sonora. Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático. XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. DOI: 10.15446/ga.v24nSupl3.95526
- Marín-Tinoco R.I., Silva-Marrufo. O. y Gonzales-Güereca, M.C. 2019. Physical Characterization Chemistry of Essential Oil of Oregano in 6 Communities of the Municipality of Rodeo, Dgo. *Journal-Urban-Rural and Regional Economy*. 3(5): 18-23. DOI:10.35429/JURRE.2019.5.3.18.23
- Marín-Tinoco, R.I., Camacho-Luis, A., Silva-Marrufo, O., Diaz-Diaz, M, y Ortega-Ramírez, A.T. 2021. Inhibition of *Candida albicans* by oregano (*Lippia* spp.) essential oil from Municipality of Rodeo, Durango, Mexico. *Journal of Microbiology & Amp; Health Education*. 3(1): 70-76. Retrieved from <http://journalmhe.org/ojs3/index.php/jmhe/article/view/14>
- Martínez-Romero, D., Serrano, M., Bailén, G., Guillén, F., Zapata, P.J., Valverde, J.M., Castillo, S., Fuentes, M. y Valero, D. 2008. The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*. 47(1): 54-60.
- Meza-Möller, A.C., Rentería-Martínez, M.E., Guerra-Camacho, M., Romo-Tamayo, F., Ochoa-Meza, A. y Moreno-Salazar, S.F. 2014. First report of root rot of watermelon caused by *Ceratobasidium* sp in Sonora, Mexico. *Plant Disease*. 98(6): 847. DOI:10.1094/PDIS-09-13-0974-PDN
- Ortega-Nieblas, M.M., Robles-Burgueño, E., Acedo-Félix, A., González-León, A., Morales-Trejo, A. y Vázquez-Moreno, L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* Wats) essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(1): 11-17.
- Padilla, E., Esqueda, M., Sánchez, A., Troncoso-Rojas, R. y Sánchez, A. 2006. Efecto de biofertilizantes en cultivo de melón con acolchado plástico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29 (4): 321-329.
- Radudiene, J., Judpintiene, A., Peiulyte, D. y Janulis, V. 2005. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *BIOLOGIJA*. 4: 53-58.
- Ramírez, S. M., Álvarez, B. A., Valenzuela, H.V., Ortega, M. P. F., Fierros, L. G. A. y Padilla. V. 2012. Detección de hongos asociados a la "rabia del garbanzo", en la zona norte de Sinaloa. Memorias XV Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas, 25 y 26 octubre 2012; Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali. 707-713 pp.
- Rivera, J.M.N. 2009. Marchitez del chile poblano (*Capsicum annuum* L.): identificación molecular del agente causal, detección en semillas, histopatología y alternativas de control. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/1302/Rivera_Jimenez_MN_DC_Produccion_Semillas_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rodríguez-Castro, A., Torres-Herrera, S., Domínguez-Calleros, A., Romero-García, A. y Silva-Flores, M. 2020. Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal*. 2: 1-13. DOI: 10.37114/abaagrof/2020.7
- Romero-Bastidas, M., Reyes-Pérez, J.J., Mayer-Félix, E.A., Hernández-Rubio, J.S., Arce-Amezquita, P.M. y Hernández-Montiel, L.G. 2020. Efectividad del extracto etanólico de *Lippia palmeri* Watson para el manejo de *Fusarium* spp. en semillas de garbanzo. *Rev. Fac. Agron*. 37: 368-386. DOI: 10.47280/RevFacAgron(LUZ).v37.n4.03
- Ruiz, C., Díaz, C. y Rojas, R. 2015. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 81(2): 81-94. ISSN 1810-634X
- Salgueiro, L.M, Cavaleiro, A, y Goncalves, C. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Médica*. 69: 80-83. DOI: 10.1055/s-2003-37032
- Sayuri, I., Duarte, M., Carmignani, P., Pulcinelli, C. y Machado, M. 2018. Effect of fungal incidence on physiological quality of tobacco seeds used in Brazil. *Arq. Ins. Biol*. 85: 1-6. DOI: 10.1590/1808-1657000352017
- Shreaz, S., Shiekh, R.A., Raja, V., Wani, W.A. y Behbehani, J.M. 2016. Impaired ergosterol biosynthesis mediated fungicidal activity of Co(II) complex with ligand derived from cinnamaldehyde. *Chem. Biol. Interact*. 247: 64-74. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.01.015
- Silva-Marrufo, O., y Marín-Tinoco, R. I. 2021. Sustituto de fungicidas químicos sintéticos con aceite esencial de orégano para el control del *Fusarium oxysporum*. *Gestión y Ambiente*, 24(Supl3), 73-80. DOI: 10.15446/ga.v24nSupl3.95526
- Silva-Rojas, H.V., Fernández-Pavía, S.P., Góngora-Canul, C., Macías-López, B. C. y Ávila-Quezada, G.D. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(2): 134-147.
- Siramon, P., Ohtani Y. y Ichiura, H. 2013. Chemical composition and antifungal property of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. *Records of Natural Products*. 7 (1): 49-53. DOI: 10.15446/ga.v24nSupl3.95526
- Stashenko, E.E. 2009. Aceites esenciales. Primera edición. *UIS-CENIVAM*. Bucaramanga, Colombia. ISBN: 978-958-44-5944-2
- Wangkhem, B., Rana, M. y Jackson, K. 2019. Exploring the control measures of white rust-organic amendments, botanicals, biocontrol agents and chemicals. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 8(3): 4413-4419. ISSN: 2278-4136
- Wogiatzi, E., Gougoulis, N., Papachatzis, A., Vagelas, I. y Chouliaras, N. 2009. Chemical composition and antimicrobial effects of greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnology y Biotechnological Equipment*. 23(3): 1322-1324. DOI: 10.1080/13102818.2009.10817662



Crecimiento y rendimiento de sandía injertada en suelo infestado con *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae)

Growth and yield of grafted watermelon in *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae) infested soil

C.I. Basto-Pool¹, V. Reyes-Oregel², E. Herrera-Parra¹, J.M. Tun-Suarez², and J. Cristóbal-Alejo^{2*}

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochá, Yucatán, México.

² Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, Yucatán, México.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el crecimiento, rendimiento y tolerancia de injertos de sandía al parasitismo de *Meloidogyne incognita*. Se injertó sandía (*Citrullus lanatus* cv. "Cal sweet") sobre portainjertos criollos regionales: 1) *Lagenaria siceraria*, 2) *Cucurbita moschata*, 3) *Cucumis melo*, 4) *Cucumis sativus* y 5) *Citrullus lanatus* cv. "Cal sweet", sin injertar. El experimento se estableció en condiciones de campo abierto en la temporada de otoño-invierno 2019. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, cada tratamiento constó de 25 plantas como unidad experimental. Se evaluaron variables agronómicas, rendimiento y tolerancia a nematodos. Las plantas injertadas florecieron ocho días antes, presentaron mayor crecimiento, incrementaron el rendimiento (18.52 t ha⁻¹) y tamaño del fruto hasta 18 % respecto al testigo. La sandía injertada sobre *L. siceraria* y *C. moschata* obtuvieron el menor índice de agallamiento (11 y 25 % respectivamente), número de huevos por un gramo de raíz (544 y 753 respectivamente) y número de hembras por un gramo de raíz teñida (12 y 22 respectivamente) en comparación con el testigo. El estudio mostró que el crecimiento, la floración y el rendimiento de las plantas injertadas fueron influenciadas positivamente por los portainjertos ante la presencia de nematodos.

Palabras clave: Cucurbitáceas, injerto, nematodo agallador, portainjertos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the growth, yield and tolerance of grafted watermelon against parasitic *Meloidogyne incognita*. Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. "Cal sweet") was grafted on regional creole rootstocks: 1) *Lagenaria siceraria*; 2) *Cucurbita moschata*; 3) *Cucumis melo* 4) *Cucumis sativus* and 5) *Citrullus lanatus* cv. "Cal sweet" ungrafted (control). The experiment was established under open field conditions in the 2019 autumn-winter season. The experimental design was randomized complete blocks, each treatment consisted of 25 plants as experimental unit. Agronomic variables, yield, and tolerance to nematodes were evaluated. The grafted plants flowered eight days earlier and presented higher growth yield (18.5 t ha⁻¹) and fruit size up to 18 % compared to the control. The watermelon grafted on the rootstocks of *L. siceraria* and *C. moschata* obtained the lowest galling index (11 and 25 % respectively), number of eggs per gram of root (544 and 753 respectively) and number of fema-

les per gram of dyed root (12 and 22 respectively) compared to the control. The study showed that growth, flowering and yield of grafted plants were significantly influenced by the rootstocks despite the presence of nematodes.

Key words: Cucurbitaceae, grafting, root-knot nematodes, rootstocks.

INTRODUCCIÓN

La sandía (*Citrullus lanatus*) es una de las hortalizas de mayor consumo en México y se cultiva en sistemas de producción en condiciones protegidas y de campo abierto (SIAP, 2022); sin embargo, existen factores fitosanitarios que limitan el cultivo, como los nematodos del género *Meloidogyne*, responsables de las mayores pérdidas de producción en hortalizas de regiones tropicales y subtropicales (Pofu *et al.*, 2011; Villocino y Quevedo, 2015). Las plantas afectadas manifiestan disminución del crecimiento, clorosis generalizada, marchitez y menor calidad de frutos, debido a que las raíces se atrofian por la formación de agallas o nódulos (Herrera-Parra *et al.*, 2011). Para su control, se aplican nematicidas sintéticos con elevados costos económicos, deterioro ambiental y afectaciones en la salud (Xie *et al.*, 2015). Una alternativa es el uso de plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes cuya fortaleza genética permite una producción sustentable (Thies *et al.*, 2016). Además, el injerto proporciona tolerancia al estrés, ayuda a mejorar la absorción de nutrientes, la calidad y el rendimiento en plantas (Thies *et al.*, 2016; Elsheery *et al.*, 2020). También, permiten mayor adaptación y desarrollo vegetativo en comparación con las plantas sin injertar (Rouphael *et al.*, 2017; Elsheery *et al.*, 2020). Rouphael *et al.* (2017) mencionan que el injerto se considera el mejor método para controlar las enfermedades causadas por fitopatógenos con origen en el suelo. Estudios previos han mostrado que la injertación en cucurbitáceas permite implementar un control sustentable de estas enfermedades (Abd-El Wanis *et al.*, 2013; Goreta-Ban *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2014; Thies *et al.*, 2015, 2016). Así, el uso de sandía injertada sobre portainjertos de *Cucumis myriocarpus* y *C. africanus* presentaron mayor tolerancia al parasitismo de *M. incognita* en comparación con los tratamientos sin injertar, éstos mermaron del 46 a 60 % su producción (Pofu *et al.*, 2012). Asimismo, en melón (*C. melo*) y pepino (*C. sativus*) injertado sobre portainjertos de *C. metuliferus* y *Citrullus colocynthis* observaron menor número de agallas y masas de huevos de *Meloidogyne* spp. (Guan *et*

*Autor para correspondencia: Jairo Cristóbal Alejo
Correo electrónico: jairoca54@hotmail.com

Recibido: 26 de Agosto de 2022

Aceptado: 29 de Enero de 2023

al., 2014; Punithaveni *et al.*, 2015). En pepino injertado sobre portainjertos de *Cucurbita argyrosperma* y *C. ficifolia* se mejoró el crecimiento y el vigor de las plantas aun en presencia de nematodos (Hernández-González *et al.*, 2014).

Con base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento, rendimiento y tolerancia de injertos de sandía al parasitismo de *M. incognita*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización geográfica y material vegetal

El estudio se realizó en el Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, ubicado al noreste de Mérida a 21° 15' LN y 89° 32' LO. El clima es cálido sub-húmedo, con temperatura y precipitación media anual de 26.8 °C y 469 mm, respectivamente (SMN, 2022).

Las semillas de los portainjertos; *Lagenaria siceraria*, *Cucurbita moschata*, *C. melo* y *C. sativus* se obtuvieron de colectas regionales de Yucatán y las semillas del injerto de sandía (*C. lanatus* cv. Cal sweet) se obtuvo de la empresa Kristen Seed, S.A. DE C.V.

Producción de plántulas e injertos

Las semillas de los portainjertos se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con musgo canadiense (Sunshine®) y 8 días después, se realizó la siembra del cultivar comercial a injertar.

Cuando las plántulas de los cuatro portainjertos y el cultivar a injertar desarrollaron la primera hoja verdadera y presentaron un diámetro de tallo superior a 2.5 mm (Pardo-Alonso *et al.*, 2019) se realizó el injerto con la técnica de aproximación (Mohamed *et al.*, 2014). Posteriormente, las plantas injertadas se mantuvieron durante 14 d en una cámara de adaptación en condiciones controladas (90 - 95 % de humedad relativa, 24 - 26 °C y 45 % de sombra) hasta el trasplante.

Se consideraron cinco tratamientos constituidos por los cuatro portainjertos de cucurbitáceas criollas: 1) *L. siceraria*, 2) *C. moschata*, 3) *C. melo*, 4) *C. sativus* y 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar.

Establecimiento del experimento

El cultivo se estableció en condiciones de campo abierto en la temporada de otoño-invierno de 2019. Se desinfectó el suelo con una caldera mediante arrastre de vapor durante 4 horas a 100 °C. Posteriormente, en macetas con capacidad de 5 kg, se depositó suelo estéril tipo cambisol de textura franco-arcilloso. Las plantas injertadas y sin injertar (testigo) se trasplantaron 15 días después de realizar el injerto. La distancia de siembra fue de 1.5 m entre plantas y 2.5 m entre filas bajo un sistema de riego por goteo. El manejo agronómico se realizó de acuerdo a la producción comercial de sandía en campo abierto (Crawford, 2017).

Una semana después del trasplante, cada maceta se inoculó con 5 mL de solución que contenía 5000 huevos larvados de *M. incognita*. Los huevos del nematodo se extrajeron de raíces agalladas de una población pura de *M. incognita* mantenida en condiciones de invernadero en

cultivos regionales de *C. melo* y *Capsicum chinense*. Para la identificación y confirmación de la especie del nematodo, se extrajeron de tres raíces de cada cultivo, 10 hembras adultas de cada raíz, y se realizaron cortes perineales para observar el patrón cuticular, con arco dorsal alto y cuadrado, formado por estrías lisas y campos laterales ausentes, con algunas estrías que se bifurcan cerca de las líneas laterales, poco visibles y con frecuencia con estrías que se orientan hacia la región vulvar, dichas características coincidieron con *M. incognita* (Eisenback *et al.*, 1983; Harman y Sasser, 1985). El inóculo se preparó siguiendo la metodología de Ayoub (1977) y se introdujo en el suelo a través de cuatro orificios de 5 cm de profundidad alrededor del tallo de cada planta.

Variables evaluadas

Las variables de crecimiento fueron medidas a los 32 d después del trasplante (ddt), seleccionando 10 plantas al azar por cada tratamiento. El diámetro de tallo se midió con un vernier digital (Truper®, modelo 14388) a 1 cm por debajo de los cotiledones; la longitud de guía se midió con un flexómetro desde la base de la raíz hasta el meristemo apical de la guía principal; el número de guías se contabilizó de forma manual; la dinámica de floración se determinó contabilizando el número de botones florales abiertos.

La biomasa seca se determinó de cuatro plantas al azar por tratamiento separando la raíz y la parte aérea (tallos y hojas) de cada planta y se secaron en un horno de convección (Felisa® modelo FE293AD) a 65 °C hasta obtener un peso seco constante. El volumen de raíz se determinó por el método de desplazamiento de volúmenes descrito por Böhm (1979) para lo cual se introdujo la raíz de cada planta en una probeta graduada con agua tomando el dato del volumen de agua desplazado por las raíces. El rendimiento se evaluó a los 65 ddt, se seleccionaron al azar 10 frutos de cada tratamiento. Se contabilizó el número y el peso de esta variable con una balanza digital (Ohaus Scout Pro® modelo SP601) y se estimó el rendimiento potencial expresado en t ha⁻¹. Para los parámetros de calidad de la fruta se seleccionaron 5 frutos al azar por cada tratamiento. El diámetro polar se determinó desde el extremo apical hasta la base del fruto y el diámetro ecuatorial se midió en la parte media del fruto, con un flexómetro. Para estimar sólidos solubles, los frutos se cortaron transversalmente desde el ápice hasta la base del fruto, se tomó la pulpa de la parte externa hacia dentro y se homogenizó con un procesador (Oster® modelo 6662-13). Se cuantificó el extracto líquido obtenido de cada fruto con un refractómetro portátil (Atago® modelo ATC) y se expresó en ° Brix.

Para estimar la tolerancia o control del nematodo, se realizó un muestreo destructivo de cuatro plantas al azar por cada tratamiento a los 60 días después de la inoculación (ddi). Las raíces se lavaron con agua para eliminar el exceso de suelo, se estimó el índice de agallamiento, mediante una escala pictórica de seis clases (Taylor y Sasser, 1983): 0: sin agallas; 1: 1 - 10 % de las raíces agalladas; 2: 11 - 25 %; 3: 26 - 50 %; 4: 51 - 75 %; y 5: 76 - 100 % de las raíces agalladas.

Como variable de reproducción del nematodo, se contabilizó el número de huevos y hembras por gramo de raíz. La extracción de huevos se realizó fragmentando la raíz de cada planta, posteriormente se homogenizó y se tomaron 2 g de raíz, un gramo se licuó durante 11 s con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 %, la suspensión resultante se vertió en tamices de malla número 50, 100, 200, 300 y 500, posteriormente la suspensión se depositó en una rejilla de conteo para nematodos bajo un microscopio compuesto (Leica® 4X modelo DM500). El restante, se tiñó con fucsina ácida a punto de ebullición durante 10 min con agua corriente, se eliminó el exceso del colorante y las raíces se depositaron en glicerina al 78 % para su disección en un microscopio estereoscópico (Leica® modelo EZ4), con el fin de contabilizar el número de hembras adultas (Ayoub, 1977).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completos al azar, cada tratamiento constó de 25 plantas como unidad experimental, mismas que constituyeron las repeticiones. A los datos obtenidos se les realizó una prueba de normalidad. Los datos en porcentaje se transformaron con la raíz cuadrada del arcoseno ($y = \arcsin(\sqrt{y/100})$) y posteriormente se realizó un análisis de varianza. En donde hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, se realizó una prueba de comparación de medias con el método de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los análisis se realizaron con el software estadístico Statistica 7 (Statsoft, Tulsa, Ok, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación agronómica de los injertos

En el diámetro de tallo se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$). Los tratamientos 1) *L. siceraria* y 2) *C. moschata* superaron en un 15 y 12 % al tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, sin embargo, los tratamientos 3) *C. melo* y 4) *C. sativus* obtuvieron los valores más bajos, superados en un 25 % en comparación con las plantas que tuvieron mayor diámetro de tallo (Tabla 1). En estudios con *Cucurbita* como portainjerto de *C. sativus*, el injerto influyó significativamente en el crecimiento y rendimiento de las plantas (Hernández-González *et al.*, 2014; Elsheery *et al.*, 2020).

En la longitud y número de guías se estimaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$), el tratamiento 1) *L. siceraria* tuvo los valores más altos (190.66 cm y 8.57), superiores a las plantas sin injertar, por lo que el injerto influyó en el crecimiento de las plantas (Tabla 1). En otros trabajos, también se reportaron en plantas injertadas, mejor crecimiento en la longitud y el número de guías (Pofu *et al.*, 2012; Hernández-González *et al.*, 2014).

En relación con la floración, a partir de los 25 ddt hasta los 46 ddt, los análisis de varianza mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$). En el tratamiento 3) *C. melo* se registró el 51 % de floración a los 25 ddt, mientras que en el tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, este pro-

Tabla 1. Efecto del injerto en el diámetro de tallo (DT), longitud de guía (LG) y número de guías secundarias (NGS) de las sandías injertadas y sin injertar.

Table 1. Graft effect on stem diameter (DT), guide length (LG) and number of secondary guides (NGS) of grafted and ungrafted watermelons.

Tratamientos	DT (mm)	LG (cm)	NGS
1) <i>L. siceraria</i>	6.74 ± 0.30 a	190.66 ± 6.54 a	8.57 ± 0.73 a
2) <i>C. moschata</i>	6.48 ± 0.37 a	182.25 ± 17.47 ab	8.41 ± 0.82 a
3) <i>C. melo</i>	4.97 ± 0.25 bc	156.96 ± 14.64 ab	7.32 ± 0.60 ab
4) <i>C. sativus</i>	4.12 ± 0.16 c	138.14 ± 12.32 b	5.13 ± 0.30 b
5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar	5.71 ± 0.31 ab	154.05 ± 13.15 ab	5.63 ± 0.18 b
CV (%)	10.12	13.03	8.83
DMS	1.21	45.68	2.31

Los datos son medias ± EE. n = 10. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

medio en floración se obtuvo a los 39 ddt. A los 46 ddt los tratamientos con plantas injertadas (1-4) alcanzaron el 100 % de la floración, mientras que en el tratamiento 5) la sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, se registró a los 53 ddt (Figura 1). El tratamiento 3) *C. melo* superó un 36 % al tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, al manifestar el 50 % de floración en menor tiempo seguido del tratamiento 1) *L. siceraria* con un 18 %. Así, el uso de plantas injertadas en especies de cucurbitáceas (*C. melo* y *L. siceraria*) como portainjertos promovieron el crecimiento de primordios florales en menor tiempo, con lo que se redujo los días a floración. Estudios publicados por Pofu *et al.* (2012) en sandía cv. Congo y cv. Charleston Gray injertados en portainjertos de *C. africanus* y *C. myriocarpus* mostraron una floración temprana del 70-81 %. Lo que hace suponer, que el injerto puede incidir sobre la precocidad en la floración, debido a procesos hormonales en interacción con variables ambientales durante el proceso de formación en la unión del injerto (Devi *et al.*, 2020).

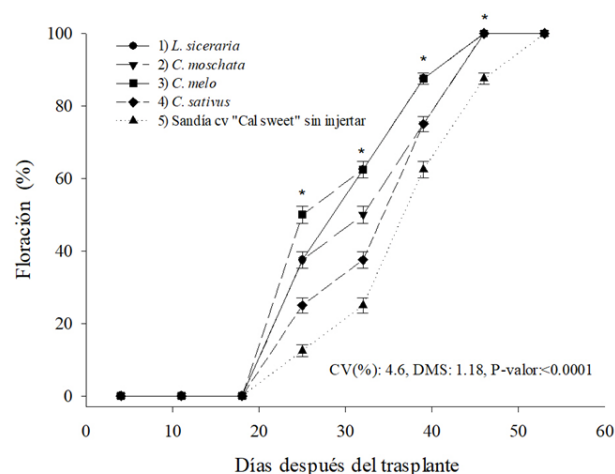


Figura 1. Dinámica de floración en plantas injertadas y sin injertar. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Los datos son medias. * = diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$) n = 25.

Figure 1. Flowering dynamics in grafted and ungrafted plants. CV = Coefficient of variation. LSD = Least significant difference. Data are means. * = significant statistical differences among treatments (Tukey, $\alpha = 0.05$) n = 25.

Aunque la injertación puede variar la expresión sexual y el orden de floración, la precocidad es atribuible a la unión portainjerto-injerto, lo cual influye en la concentración endógena de hormonas, lo que modifica el desarrollo y la fisiología de las plantas (Pofu et al., 2012).

En la biomasa seca foliar el análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$). Los mejores tratamientos fueron: 3) *C. melo*, 1) *L. siceraria* y 2) *C. moschata* con promedios de 55.9, 53.2 y 51.9 g, respectivamente, lo que superaron en 36, 33 y 31 % al tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar. En el volumen y biomasa seca de raíz, el tratamiento 3) *C. melo* fue significativo ($P \leq 0.01$) en comparación con los demás tratamientos, al registrar valores de 29.3 cm³ y 2.5 g equivalente en 20 y 21 % superior al tratamiento 5) la sandía cv. "Cal sweet" sin injertar (Tabla 2). Por lo que la injertación mejoró la biomasa y el volumen de raíz. Incluso, en condiciones de estrés por sequía; plantas de sandía, injertadas sobre *Cucurbita* se han obtenido resultados significativos en el desarrollo del sistema de raíces y número de hojas (Poor, 2015). Es evidente una relación entre parte vegetativa-raíz, lo que es indicativo del crecimiento de la parte aérea, vinculado con el sistema de raíces y correlacionado con el crecimiento de ambos, lo que induce incrementos en biomasa (Pofu et al., 2012; Hernández-González et al., 2014). Lo que favorece en los injertos mayor crecimiento de raíz, mejor adaptación y desarrollo de las plantas, aun cuando se establecen en suelos con problemas por fitopatógenos (Thies et al., 2016; Roupheal et al., 2017).

Tabla 2. Efecto del injerto en biomasa seca foliar (BSF), biomasa seca de raíz (BSR) y volumen de raíz (VR) en sandía (cv. "Cal sweet").

Table 2. Grafting effect on foliar dry biomass (BSF), root dry biomass (BSR) and root volume (VR) in watermelon (cv. "Cal sweet").

Tratamientos	BSF (g)	BSR (g)	VR (cm ³)
1) "Cal sweet" sobre <i>L. siceraria</i>	53.23 ± 2.96 a	1.67 ± 0.28 ab	22.67 ± 1.76 ab
2) "Cal sweet" sobre <i>C. moschata</i>	51.90 ± 2.02 a	0.80 ± 0.17 ab	13.33 ± 2.40 bc
3) "Cal sweet" sobre <i>C. melo</i>	55.93 ± 2.41 a	2.50 ± 0.60 a	29.33 ± 2.33 a
4) "Cal sweet" sobre <i>C. sativus</i>	30.80 ± 1.02 b	0.33 ± 0.14 b	7.33 ± 2.40 c
5) "Cal sweet" sin injertar (testigo)	35.60 ± 1.20 b	1.97 ± 0.27 ab	23.33 ± 1.76 ab
CV (%)	11.34	14.94	11.56
DMS	10.92	1.82	11.12

Los datos son medias ± EE. n = 4. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

En el rendimiento, se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.0467$) entre tratamientos, los tratamientos injertados superaron al testigo. La productividad se incrementó con el tratamiento 2) *C. moschata*, al producir un rendimiento potencial de 18.5 t ha⁻¹, superior en 35 % al

tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar con 12.0 t ha⁻¹ (Figura 2). En otro estudio con plantas de pepino, injertadas sobre *C. maxima* x *C. moschata* (Strong Tosa) se incrementó el rendimiento (30 - 50 %) en comparación con las plantas sin injertar (Goreta-Ban et al., 2014). En sandía, injertadas sobre *C. lanatus* var. Citroides) se incrementó del 27 - 34 % el rendimiento y hasta 50 % el tamaño del fruto en comparación con plantas sin injertar (Thies et al., 2015). También, en portainjertos de *C. africanus* y *C. myriocarpus* con el cv. Congo y el cv. Charleston Grey, se incrementó el rendimiento en 46 y 115 % (Pofu et al., 2012). Mientras portainjertos *C. maxima* x *C. moschata* incrementaron el rendimiento en 40 y 46 % sobre plantas sin injertar (Soteriou y Kyriacou, 2014).

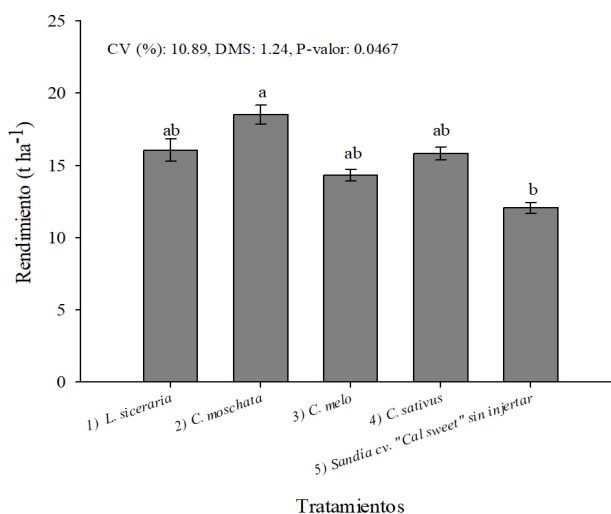


Figura 2. Rendimiento potencial de sandía (cv. "Cal sweet") injertada en portainjertos de cucurbitáceas de la región. Los datos son medias. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$) n = 10.

Figure 2. Potential yield of watermelon (cv. "Cal sweet") grafted on cucurbit rootstocks from the region. Data is mean. CV = Coefficient of variation. LSD = Least significant difference. Different letters indicated significant differences among treatments (Tukey, $\alpha = 0.05$) n = 10.

En relación con el tamaño del fruto, en general, las plantas injertadas fueron de mayor tamaño comparado con los frutos de plantas sin injertar. El fruto de mayor tamaño se produjo en el tratamiento 2) *C. moschata*, con 66 cm de longitud y 51.7 cm de diámetro ecuatorial, superior en 16 y 18 % a los frutos del tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar (Tabla 3). El tamaño de frutos, también se reportó con portainjertos de *Cucurbita* y *C. lanatus*, en ambos portainjertos incrementaron el peso del fruto en 24 % (Fredes et al., 2016).

Con respecto al contenido de sólidos solubles, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las plantas injertadas y sin injertar (Tabla 3), por lo que el injerto no afectó el contenido de azúcares, aun cuando hay evidencia donde se muestran que la cantidad de azúcares totales en frutos puede ser modificada por los portainjertos (Abd-El Wanis et al., 2013; Villocino y Quevedo, 2015).

Tabla 3. Longitud del fruto (LFR), diámetro ecuatorial (DE) y contenido de sólidos solubles (CSS) de sandía (cv. "Cal sweet") injertada en diferentes especies de portainjertos.

Table 3. Fruit length (LFR), equatorial diameter (DE) and soluble solids content (SSC) of watermelon (cv. "Cal sweet") grafted on different rootstock species.

Tratamientos	LFR (cm)	DE (cm)	CSS (° Brix)
1) "Cal sweet" sobre <i>L. siceraria</i>	61.88 ± 3.79 ab	50.13 ± 1.38 ab	7.0 ± 1.04 a
2) "Cal sweet" sobre <i>C. moschata</i>	66.00 ± 3.46 a	51.75 ± 2.49 a	8.5 ± 0.57 a
3) "Cal sweet" sobre <i>C. melo</i>	62.75 ± 3.47 ab	46.13 ± 2.51 ab	8.5 ± 0.86 a
4) "Cal sweet" sobre <i>C. sativus</i>	63.38 ± 3.75 ab	45.60 ± 2.55 ab	7.6 ± 0.33 a
5) "Cal sweet" sin injertar (testigo)	55.25 ± 3.68 b	42.25 ± 0.59 b	8.5 ± 0.28 a
CV (%)	11.71	11.61	12.82
DMS	8.48	7.90	2.66

Los datos son medias ± EE. n = 5. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Respuesta de tolerancia a *M. incognita*

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos (Tabla 4). Las plantas del tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, como se esperaba mostraron susceptibilidad a *M. incognita*, en las que se estimaron los mayores índices de agallamiento (76 - 100 %) y mayor población del nematodo (3, 340 huevos y 126 hembras), en comparación con los tratamientos de plantas injertadas. En los tratamientos 1) *L. siceraria* y 2) *C. moschata* se registraron los menores índices de agallamiento con promedios de 11 y 25 %, menor número de huevos con 544 y 753 y menor número de hembras por gramo de raíz con 12 y 22, respectivamente, lo que significó respecto al tratamiento 5) sandía cv. "Cal sweet" sin injertar, una disminución en el daño de raíces del 79.5 %, en la producción de huevos del 77.5 a 83.4 % y en la formación de hembras del 82.5 a 90.4 % (Tabla 4). De acuerdo con Punithaveni *et al.* (2015) algunas especies de cucurbitáceas pueden desarrollar tolerancia a *M. incognita*, como ocurrió en este estudio, y en trabajos con portainjertos de *Cucumis* contra esta especie de nematodo agallador (Guan *et al.*, 2014). El efecto de los tratamientos con portainjertos regionales tolerantes a *M. incognita*, para la producción de sandía, presentaron la menor intensidad de la enfermedad, con lo que se promovió mejor crecimiento y rendimiento del cultivo y no se afectó el contenido de sólidos solubles, lo que hace sugerir, la implementación de especies regionales de cucurbitáceas como portainjertos para el cultivo sostenible de la sandía, en suelo infestados con el nematodo (Pofu *et al.*, 2011, 2012; Goreta-Ban *et al.*, 2014; Thies *et al.*, 2015, 2016).

Tabla 4. Parámetros de tolerancia en plantas de sandía cv. "Cal sweet" injertadas y sin injertar cultivadas en suelo infestado de *M. incognita*.

Table 4. Tolerance parameters in watermelon plants cv. "Cal sweet" grafted and ungrafted grown in *M. incognita* infested soil.

Tratamientos	IA	NHU	NHE
1) "Cal sweet" sobre <i>L. siceraria</i>	2.0 ± 6.67 b	544 ± 11.05 e	12 ± 1.76 e
2) "Cal sweet" sobre <i>C. moschata</i>	2.0 ± 6.67 b	753 ± 10.54 d	22 ± 1.45 d
3) "Cal sweet" sobre <i>C. melo</i>	4.2 ± 14.43 ab	1 334 ± 10.97 b	48 ± 1.67 b
4) "Cal sweet" sobre <i>C. sativus</i>	3.0 ± 15.00 b	1 192 ± 11.02 c	37 ± 1.73 c
5) "Cal sweet" sin injertar (testigo)	5.0 ± 0.00 a	3 340 ± 12.84 a	126 ± 2.03 a
CV (%)	25.62	23.51	23.51
DMS	2.21	44.73	8.64

IA = Índice de agallamiento de raíz; NHU = Número de huevos por g de raíz; NHE = Número de hembras por un g de raíz. Los datos son medias ± EE. n = 4. Escala del IA (0-5): 0 = 0, 1 = 1 - 10 %, 2 = 11 - 25 %, 3 = 26-50 %, 4 = 51 - 75 %, 5 = 76 - 100 %. CV = Coeficiente de variación. DMS = Diferencia mínima significativa. Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

CONCLUSIONES

El crecimiento y la producción de biomasa de las plantas injertadas fueron influenciadas significativamente por los portainjertos, el injerto indujo la precocidad de floración, aumentó el rendimiento y el tamaño del fruto, pero sin cambios en el contenido de sólidos solubles. Las plantas injertadas en portainjertos de *L. siceraria* y *C. moschata* presentaron la mayor tolerancia a *M. incognita*.

REFERENCIAS

- Abd El-Wanis, M.M., Amin, A.W. y Abdel El Rahman, T.G. 2013. Evaluation of some cucurbitaceous rootstocks 2-Effect of cucumber grafting using some rootstocks on growth, yield and its relation with root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and fusarium wilt, infection. Egyptian Journal of Agricultural Research 91: 235-257.
- Ayoub, M. S. 1977. Plant Nematology: An Agricultural Training aid. Department of food and Agriculture. USA Division of Plant Industry Laboratory Services Nematology.
- Böhm, W. 1979. Root parameters and their measurement. En: Methods of Studying Root Systems. W. D. Billings., F. Golley., O. L. Lange., J. S. Olson (ed), pp 125-138. Springer. New York.
- Crawford, H.L. 2017. Sistema de producción. En: Manual de manejo agronómico para el cultivo de sandía. P.R. Abarca (ed.), pp 47-62. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Santiago, Chile.
- Devi, P., Perkins-Veazie, P. y Miles, C. 2020. Impact of grafting on watermelon fruit maturity and quality. Horticulturae 6:97.
- Eisenback, J. D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. y Triantaphyllou, A.C. 1983. Guía para la identificación de cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies), con una clave pictórica. (Traducción de Carlos Sosa-Moss). International Meloidogyne Project. Raleigh, North Carolina, USA.

- Elsheery, N.I., Helaly, M.N., Omar, S. A., John, S. V., Zabochnicka-Swiątek, M., Kalaji, H. M. y Rastogi, A. 2020. Physiological and molecular mechanisms of salinity tolerance in grafted cucumber. *South African Journal of Botany* 130: 90-102.
- Fredes, A., Roselló, S., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., Pérez-de-Castro, A., Gisbert, C. y Picó, M.B. 2016. Fruit quality assessment of watermelons grafted onto citron melon rootstock. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97: 1646-1655.
- Goreta-Ban, S., Zanic, K., Dumiciv, G., Raspudic, E., Vuletin, S.G. y Ban, D. 2014. Growth and yield of grafted cucumbers in soil infested with root-knot nematodes. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74: 29- 34.
- Guan, W., Zhao, X., Dickson, D.W., Mendes, M.L., y Thies, J. 2014. Root-knot nematode resistance, yield, and fruit quality of specialty melons grafted onto *Cucumis metulifer*. *HortScience* 49: 1046-1051.
- Hartman, K. M. y Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. K. R. C. Baker., C. Carter., J. N. Sasser (ed). pp. 69-77. North Carolina State University Graphics. Raleigh, NC, USA.
- Hernández-González, Z., Sahagún-Castellanos, J., Espinosa-Robles, P., Colinas-León, M.T. y Rodríguez-Pérez, J.E. 2014. Effect of rootstock on yield and fruit size in grafted cucumber. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 41-47.
- Herrera-Parra, E., Cristóbal, A.J., Tun, J.M., Góngora, J.A. y Lomas, C.T. 2011. Nematofauna nociva (*Meloidogyne* spp.) en cultivos hortícolas tropicales: Distribución y perspectivas de manejo en Yucatán. En: *Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México*. M. Gamboa-Angulo y R. Rojas-Herrera (ed.), pp 121-134. CICY-UADY-SAGARPA.
- Mohamed, F. H., Abd El-Hamed, K.E., Elwan, M.W. y Hussien, M.N. 2014. Evaluation of different grafting methods and rootstocks in watermelon grown in Egypt *Scientia Horticulturae*. 168: 145-150.
- Pardo-Alonso, J.L., Carreño-Ortega, Á., Martínez-Gaitán, C.C. y Callejón-Ferre, Á.J. 2019. Combined influence of cutting angle and diameter differences between seedlings on the grafting success of tomato using the splicing technique. *Agronomy* 9: 1-15.
- Pofu, K.M., Mashela, P. y Waele, D.D. 2012. Survival, flowering and productivity of watermelon (*Citrullus lanatus*) cultivars in intergeneric grafting on nematode-resistant *Cucumis* seedling rootstocks in *Meloidogyne*-infested fields. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 217-222.
- Pofu, K.M., Mashela, P.W. y Mphosi, M.S. 2011. Management of *Meloidogyne incognita* in nematode susceptible watermelon cultivars using nematode resistant *Cucumis africanus* and *Cucumis myriocarpus* rootstocks. *African Journal of Biotechnology* 10: 8790-8793.
- Poor, R.E. 2015. Investigating the effect of grafted watermelon on tolerance to drought and salinity. *J. Novel Appl. Sci* 4: 670-673.
- Punithaveni, V., Jansirani, P. y Sivakumar, M. 2015. Screening of cucurbitaceous rootstocks and cucumber scions for root knot nematode resistance (*Meloidogyne incognita* Kofoid and White). *Journal of Plant Breeding* 6: 486-492.
- Rouphael, Y., Venema, J. H., Edelstein, M., Savvas, D., Colla, G., Ntatsi, G., Ben-Hur, M., Kumar, P. y Schwarz, D. 2017. Grafting as a tool for tolerance of abiotic stress. En: *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. G. Colla, F. Pérez-Alfocea y D. Schwarz (ed.), pp 171-216. CABI: Wallingford, UK.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. [Consultado 10 enero 2022]. 2022. Disponible en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio Meteorológico Nacional SMN. [Consultado 10 enero 2022]. 2022. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/>
- Soteriou, G. A., y Kyriacou, M. C. 2014. Rootstock mediated effects on watermelon field performance and fruit quality characteristics. *Intern. J. Vegetable Sci* 21, 344-362.
- Statistica System reference StatSoft Inc. 2011. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.
- Taylor, A.L. y Sasser, J.N. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz*. Raleigh, Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA.
- Thies, J.A., Ariss, J.J., Hassell, R.L., Buckner, S. y Levi, A. 2015. Accessions of *Citrullus lanatus* var. citroides are valuable rootstocks for grafted watermelon in fields infested with Root-Knot nematodes. *HortScience* 50: 4-8.
- Thies, J.A., Ariss, J.J., Kousik, C.S., Hassell, R.L. y Levi, A. 2016. Resistance to southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in wild watermelon (*Citrullus lanatus* var. citroides). *Journal of Nematology* 48: 14-19.
- Villocino, S.B. y Quevedo, M.A. 2015. Effects of grafting on flowering, fruiting and fruit quality of "Sweet 16" Watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.). *Acta Horticulturae* 1088: 469-472.
- Xie, H., Yan, D., Mao, L., Wang, Q., Li, Y., Ouyang, C., Guo, M. y Cao, A. 2015. Evaluation of methyl bromide alternatives efficacy against soil-borne pathogens, nematodes and soil microbial community. *Plos One* 10: 1-12.



Inhibición de adhesión bacteriana en catéteres vasculares por el péptido antimicrobiano AP7121

Inhibition of bacterial adherence to vascular catheters by the antimicrobial peptide AP7121

Sabina Lissarrague¹, Laureano Schofs², Mariana Bistoletti¹, Leonardo García Allende³, Andrea Lallée¹, Beatriz Baldaccini¹, Sergio Sánchez Bruni², Mónica Sparo*¹

¹ Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina;

² Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina- CIVETAN- CONICET;

³ Hospital Privado de Comunidad de Mar del Plata, Argentina.

RESUMEN

Las infecciones del torrente sanguíneo asociadas a los cuidados de la salud constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La infección relacionada con catéteres vasculares es su fuente principal. Las bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp., constituyen uno de los agentes etiológicos más frecuentes. Objetivo: evaluar la actividad inhibitoria del AP7121 sobre la adherencia de *Staphylococcus aureus* en catéteres vasculares. Se utilizó la cepa productora de *biofilm* *S. aureus* ATCC 35556 (SA). Se estimó CIM_{AP7121} para SA, se inocularon segmentos de 20 mm de catéter vascular (n = 3) con 10^4 UFC mL^{-1} de SA. Se probaron tres esquemas diferentes (A: simultáneo, B: anterior y C: después del desafío bacteriano) utilizando $1 \times CIM_{AP7121}$. Se incluyeron grupos de control en cada esquema. La CIM_{AP7121} fue 0,48 mg/L. Con los esquemas A y B se logró una reducción de 2 logaritmos que representa una disminución del 99 % de células viables. El tratamiento posterior a la exposición con AP7121 (esquema C) produjo una reducción de 1 logaritmo que representa una disminución del 90 % de células viables. Estos resultados sugieren una rápida actividad antimicrobiana de AP7121 que podría ser beneficiosa para reducir la adherencia bacteriana en catéteres vasculares.

Palabras claves: péptido antimicrobiano AP7121, catéter vascular, adhesión bacteriana, inhibición

ABSTRACT

Healthcare-associated bloodstream infections are the leading cause of morbidity and mortality in hospitalized patients. Vascular catheter-related infection is its main source. Gram-positive bacteria, mainly *Staphylococcus* spp., are the most prevalent etiological agents. Our aim was to assess the inhibitory activity of the AP7121 on the *Staphylococcus aureus* adherence in vascular catheters. The biofilm-producer strain *S. aureus* ATCC 35556 (SA) was used. MIC_{AP7121} for SA was performed using 20 mm segments of the vascular catheter (n = 3) were inoculated with 10^4 UFC mL^{-1} of SA. Three different treatment schemes (A: simultaneous, B: previous, and C: following bacterial challenge) using $1 \times MIC_{AP7121}$ were tested. Control groups were included in each scheme. The MIC_{AP7121}

was 0.48 mg/L. A reduction of $2\log_{10}$ representing a decrease of 99 % of viable SA cells was achieved with schemes A and B. The post-challenge treatment with AP7121 (scheme C) produced a reduction of $1\log_{10}$ representing a 90 % decrease of viable SA cells. The results observed in this work suggest an AP7121 fast-antimicrobial activity that could be beneficial to reduce bacterial adherence on medical devices such as vascular catheters.

Keywords: antimicrobial peptide AP7121, vascular catheter, bacterial adherence, inhibition

INTRODUCCIÓN

En el mundo las infecciones sanguíneas asociadas a los cuidados de la salud constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad. Las más frecuentes son primarias y están relacionadas con los catéteres vasculares. Las bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp., son los agentes más frecuentes (74 - 92 % del total). Las bacterias se adhieren a las superficies abióticas formando biopelículas (*biofilms*) que los preservan de la eliminación mecánica, de los antimicrobianos sistémicos y del sistema inmune del huésped.

Las biopelículas están conformadas por comunidades complejas de microorganismos que están adheridos generalmente a superficies sólidas o líquidas y embebidos en una matriz exopolisacárida y, surgen como una estrategia de supervivencia en ambientes hostiles. Las infecciones relacionadas con biopelículas tienen un significativo impacto clínico (65 - 80 % del total). Las biopelículas están implicadas en las infecciones relacionadas con el uso de dispositivos biomédicos. La inhibición de formación de biopelículas constituye la principal estrategia de prevención de bacteriemias relacionadas con catéteres intravasculares (Gahlot *et al*, 2014; Wallace *et al.*, 2017).

Actualmente los catéteres intravasculares pueden impregnarse con antibióticos para disminuir la incidencia de infecciones en pacientes críticos (Donelli y Francolini, 2001). Este uso conlleva el riesgo de inducir la emergencia de cepas multirresistentes o la infección en el paciente por bacterias resistentes al antibiótico impregnado en el catéter.

*Autor para correspondencia: **Mónica Sparo**
 Correo electrónico: msparo@salud.unicen.edu.ar
Recibido: 23 de septiembre de 2022
Aceptado: 10 de marzo de 2023

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud la mayoría de las drogas en desarrollo son modificaciones de antibióticos existentes, ofreciendo beneficios a corto plazo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias con multirresistencia a los antimicrobianos (Inoue y Minghui, 2017). Por lo tanto, se ha prestado especial atención a la evaluación de la aplicación de péptidos antimicrobianos de origen bacteriano para la atención de pacientes, por su eficacia y velocidad bactericida *in vitro* (Cavera *et al.*, 2015; Delpech *et al.*, 2017).

Enterococcus faecalis CECT7121 (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Burjasot, Valencia, España) es una cepa probiótica productora de un péptido antimicrobiano de 4726 Da con actividad bactericida sobre bacterias Gram positivas denominado AP7121 (Sparo *et al.*, 2006; 2009; Delpech *et al.*, 2017; Delpech *et al.*, 2019).

Previamente, se ha demostrado la actividad anti-biopelícula *in vitro* de AP7121 sobre múltiples aislamientos de origen clínico de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* multirresistentes y la prevención de formación de biopelículas por estas bacterias en una superficie abiótica (Delpech *et al.*, 2020).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad inhibitoria de adhesión bacteriana sobre catéteres intravasculares utilizados en Medicina Humana mediante experimentos de tratamiento con AP7121 previo, simultáneo o posterior al desafío con una cepa de colección internacional productora de biopelícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción del péptido AP7121

Se aisló AP7121, siguiendo la metodología descrita previamente (Sparo *et al.*, 2009). En resumen, se incubó la cepa probiótica *E. faecalis* CECT7121 a 35 ± 2 °C, durante 18 h, en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina). Se inoculó el cultivo en 4 L de caldo BHI e incubó a 35 ± 2 °C, durante 9 h. Luego, se centrifugó a 15.000 g, a 4 °C, durante 20 min. El sobrenadante se ajustó a pH: 7,0 y se precipitó de acuerdo a Dawson *et al.* (1969). Se centrifugó a 20.000 g, a 4 °C, durante 20 min. El precipitado se re-suspendió en 40 mL de buffer fosfato salino (PBS), 5 mM, pH: 7,0. El péptido AP se aisló mediante una extracción físico-química, empleando cartuchos Sep-Pak™ C18 (Waters, Milford, EE.UU.). El extracto de *E. faecalis* (5 mL) se cargó en un cartucho, lavado previamente con acetonitrilo en ácido trifluoro acético (TFA, 0,1 %) y se eluyó con acetonitrilo (60 %)-TFA (0,1 %). El eluato se evaporó a sequedad utilizando una centrifuga de vacío (ThermoSavant Instruments, Hollbrook, EE.UU.). Se re-suspendió el precipitado en PBS (250 µL). Se inyectaron alícuotas de la suspensión (20 µL) en un sistema HPLC de fase reversa (Shimadzu, Kyoto, Japón) y se separaron en una columna Nucleosil C18 (5 µm, Pharmacia, Uppsala, Suecia). Fase móvil: buffer A (TFA 0,1 %) y buffer B (acetonitrilo 95 % en TFA 0,1 %). AP se eluyó en un gradiente lineal (95 % A/5 % B a 15 % A/85 % B), con una tasa de flujo de 0,2 mL/min, controlando la elución con un detector UV.

Se recolectaron las fracciones en periodos regulares. Se evaporó la fracción activa hasta sequedad y se re-suspendió en buffer fosfato (50 mM, pH: 7,0). Se determinó la actividad inhibitoria sobre *S. aureus* ATCC 35556 por el método de difusión en pocillos previamente descrito (Sparo *et al.*, 2009). Se detectó actividad biológica de AP7121 luego de 30 min de la inyección de la muestra, con aproximadamente 40 % de buffer B. Se determinó la concentración de AP7121 (Kit de ensayo de proteínas Pierce™ Coomassie, Thermo Scientific™). Finalmente se liofilizó hasta su posterior análisis.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM_{AP7121})

Se utilizó para el ensayo la cepa formadora de biopelícula *S. aureus* ATCC 35556, SA (Seidi *et al.*, 2008).

Se determinó la CIM_{AP7121} de SA mediante el micro-método de dilución en caldo. Brevemente, una colonia de SA (desarrollo de 18 h en agar BHI) se inoculó en caldo BHI y se incubó durante 18 h a 35 ± 2 °C. Posteriormente cada aislamiento se inoculó en un caldo BHI fresco y se incubó hasta una absorbancia de 0,05 a 595 nm de longitud de onda. Alícuotas (20 µL) de diluciones seriadas de AP7121, en un rango de 0,25 mg/L a 64 mg/L, se agregaron a cada pocillo de las placas estériles (96 pocillos) que contenía 80 µL del cultivo de cada aislamiento. Se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 h con agitación continua y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se definió la CIM como la menor concentración de AP7121 que inhibió completamente el desarrollo bacteriano. Se efectuaron tres experimentos por duplicado.

Determinación del tiempo de contacto

Se utilizaron segmentos (20 mm) de catéteres intravasculares (CV) de poliuretano (BILUM S, KFF S.A.; Argentina). Cada una de las secciones del CV se colocó en una solución de AP7121 durante 4, 2, 1 h, 30 min. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado. Cada sección del catéter se introdujo en la solución de AP7121 de forma que todas las muestras completaran su contacto requerido al mismo tiempo. Luego los segmentos se transfirieron a tubos conteniendo 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa *S. aureus* ATCC 35556, siguiendo el procedimiento descrito en el Protocolo B. Se realizaron tres experimentos por duplicado.

Estudios de adhesión en catéter

Para los estudios de adhesión en CV se ensayaron tres protocolos (A, B y C).

Protocolo A = Se sumergieron 3 segmentos (20 mm) de CV en una solución de AP7121 de concentración final CIMx1 y aproximadamente 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa.

Protocolo B = tres segmentos de CV se pre-incubaron durante el tiempo óptimo de contacto, establecido previamente, con una solución de AP7121 CIMx1 de concentración final y luego los segmentos se transfirieron a tubos conteniendo 10^4 UFC·mL⁻¹ de la cepa.

Protocolo C = tres segmentos de CV fueron pre-incubados con la cepa (10^4 UFC·mL⁻¹) durante 3 h, y se agregó el

AP7121 a concentraciones final de CIMx1.

Como controles en cada protocolo se agregó un grupo con CV no tratados con AP7121.

Las muestras de los protocolos A, B y C se incubaron durante 18 h a 37 °C. Posteriormente los segmentos de CV fueron lavados dos veces en BF y las bacterias fueron eliminadas mediante sonicación durante 5 min (Sonic Fisher Scientific, 500). Se determinó el número de células viables mediante recuento bacteriano en agar y se relacionó con el área de superficie del catéter. Los experimentos fueron realizados tres veces por duplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como media \pm DE (desviación estándar). Los resultados se sometieron a análisis de varianza y, cuando era apropiado, a la prueba de Kruskal-Wallis para examinar la existencia de diferencias. Los valores se consideraron significativamente diferentes entre sí cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la cepa *S. aureus* ATCC 35556 se obtuvo una $CIM_{AP7121} = 0,48$ mg/L. El tiempo mínimo óptimo de contacto del péptido con el CV fue de 2 h ya que se observó un descenso significativo de las células viables (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación del tiempo de pre-incubación de CV con AP7121.

Table 1. Determination of CV pre-incubation time with AP7121.

Protocolo Pre-incubación (horas)	<i>S. aureus</i> Control (Log_{10} UFC/mm ²)	<i>S. aureus</i> + AP7121 (Log_{10} UFC/mm ²)	Valor de p^a
4 h	6.42 \pm 0.08	4.31 \pm 0.09	$p < 0.001$
2 h	6.35 \pm 0.10	4.28 \pm 0.08	$p < 0.001$
1 h	6.27 \pm 0.12	5.79 \pm 0.11	$p > 0.05$
30 min	6.36 \pm 0.13	6.29 \pm 0.10	$p > 0.05$

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

^aANOVA y Kruskal-wallis test.

En relación a los estudios de adhesión al catéter, como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 1, se observó un descenso significativo de bacterias viables ($p < 0,001$) de *S. aureus* en 2 log_{10} (99,0 % de la población) cuando se agregó el péptido con la bacteria (A) y antes (2 h) de la adhesión bacteriana (B). En el protocolo C el descenso de viables también fue significativo ($p < 0,01$) ya que el descenso de viables fue de 1 log_{10} (90 % de la población).

Los grupos en riesgo por cateterización venosa de larga duración son los pacientes con quimioterapia, prematuros, trasplantados de precursores de células hematopoyéticas, con alimentación parenteral, dializados (Pitiriga *et al.*, 2020). En este contexto, se planteó como objetivos generales: Investigar la potencial aplicación del péptido antimicrobiano AP7121 en Medicina Humana, focalizando los estudios en la actividad inhibitoria de AP7121 sobre la adhesión de bacterias a dispositivos médicos como son los catéteres vasculares.

Hasta el momento, la investigación para el desarrollo de péptidos antimicrobianos con fines terapéuticos se ha

Tabla 2. Efecto de AP7121 sobre la adhesión a CV de *S. aureus* ATCC 35556.

Table 2. Effect of AP7121 on *S. aureus* ATCC 35556 adhesion to CV.

Protocolo	<i>S. aureus</i> Control (Log_{10} UFC/mm ²)	<i>S. aureus</i> + AP7121 (Log_{10} UFC/mm ²)	Valor de p^a
A	6.18 \pm 0.06	4.11 \pm 0.05	$p < 0.001$
B	6.12 \pm 0.12	4.01 \pm 0.08	$p < 0.001$
C	6.31 \pm 0.11	5.27 \pm 0.13	$p < 0.01$

Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

^aANOVA y Kruskal-wallis test.

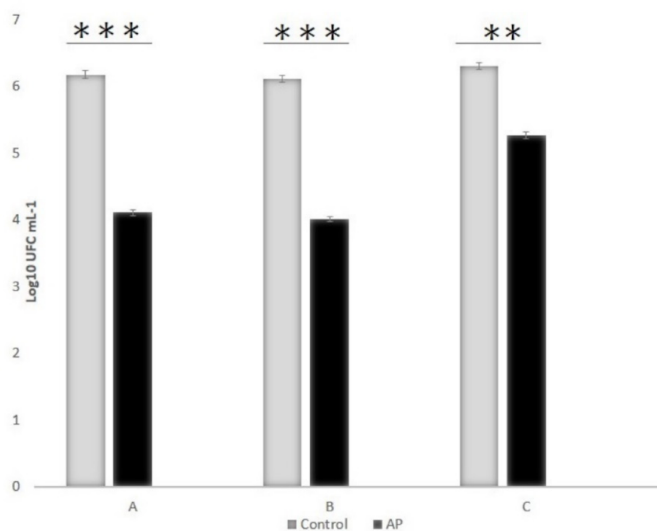


Figura 1. Efecto de AP7121 sobre la adhesión a CV de *S. aureus* ATCC 35556.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. A, B, C: Protocolo A; Protocolo B; Protocolo C.

Figure 1. Effect of AP7121 on *S. aureus* ATCC 35556 adhesion to CV.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. A, B, C: Protocol A; Protocol B; Protocol C.

enfocado en bacteriocinas como nisina, lacticina y listostafina (Hassan *et al.*, 2012). La bacteriocina más estudiada, nisina, se ha propuesto como barrera antimicrobiana porque pueden adsorberse en las superficies y prevenir la adhesión bacteriana (Bower *et al.*, 2001). De hecho, la adhesión de tres bacterias médicamente relevantes (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*) se inhibió significativamente tubos de succión tratados con nisina (Bower *et al.*, 1998). Godoy-Santos *et al.* (2018) demostraron que la nisina producía permeabilización de la membrana de bacterias sésiles y mostró concordancia entre la pérdida de viabilidad y la pérdida de integridad de la membrana.

En ensayos *in vitro* realizados con las bacteriocinas Pep5 y epidermina se observó una disminución significativa en el número de células viables de *S. epidermidis* adheridas a catéteres intravasculares de silicona (Fontana *et al.*, 2005).

S. aureus puede formar biopelículas sobre diversos biomateriales y son responsables de infecciones recurrentes en pacientes hospitalizados por tiempo prolongado (Nan *et al.*, 2015). Las biopelículas maduras son de difícil erradicación, complicando el tratamiento del agente patógeno (Dosler y Mataraci, 2013). AP7121 impide la colonización de *S. aureus* sobre CV y por lo tanto también constituye una potencial herramienta para la prevención de infecciones por formación de biopelículas.

Este estudio mostró que AP7121 previene la colonización de *S. aureus* productor de biopelícula en una superficie inerte como son los CV. El análisis del recuento de células viables mostró diferencias significativas entre el segmento no tratado (control) y el tratado (experimental) con AP7121.

La formación de biopelículas conduce a una pobre penetración de los antimicrobianos e incrementa la farmacoresistencia, ratificando la necesidad de explorar nuevos compuestos alternativos. En este estudio se demostró que AP7121 fue eficaz en inhibición de la formación de biopelículas estafilocócicas y tuvo efectos inhibitorios y bactericidas sobre células de biopelículas ya establecidas, lo que demuestra que también fue capaz de atravesar biopelículas existentes. La actividad de AP7121 sobre las bacterias sésiles se facilita por su carácter hidrofóbico, y la producción de muerte por lisis bacteriana formando poros en la membrana (Sparo *et al.*, 2006; 2009; Delpech *et al.*, 2020).

Es importante destacar que en AP se ha demostrado la ausencia de efectos citotóxicos (Sparo, 2006).

CONCLUSIONES

El péptido AP7121 podría constituir una potencial herramienta para la inhibición de formación de biopelículas en CV. Los resultados preliminares obtenidos *in vitro* indican una acción rápida del péptido AP7121, sugiriendo que podría aplicarse previamente o en el momento de la colocación de catéteres vasculares y con posibilidad de aplicación sucesiva durante el uso del dispositivo médico. Sin embargo, son necesarios futuros estudios *in vivo* para validar su eficacia.

REFERENCIAS

- Bower, C.K., Bothwell, M.K. y McGuire, J. 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 22:259-265.
- Bower, C.K., Daeschel, M.A. y McGuire, J. 1998. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion. *Journal of Dairy Science*. 81:2771-2778.
- Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D. y Chikindas, M.L. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46, 494-501.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th ed. CLSI Document M100. Wayne, PA: CLSI.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. 1969. Data for Biochemical Research, Clarendon Press, p.622. Oxford.
- Delpech, G., Bistoletti, M., Ceci, M., Lissarrague, S., Bruni, S.S. y Sparo, M. 2017. Bactericidal activity and synergy studies of peptide AP-CECT7121 against multi-resistant bacteria isolated from human and animal soft-tissue infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 9: 355-362.
- Delpech, G., Ceci, M., Lissarrague, S., García Allende, L., Baldaccini, B. y Sparo, M. 2020. In vitro activity of antimicrobial peptide AP7121 against human methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilm producers. *Biofouling*. 36 (2): 257-267.
- Delpech, G., Hebert, E.M., Sparo, M. y Saavedra, L. 2019. Draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* strain CECT7121, a corn silage isolate with antibacterial activity against Gram-positive pathogens". *Microbiology Resource Announcements*. 8:e00245-19.
- Donelli, G. y Francolini, I. 2001. Efficacy of antiadhesive, antibiotic, and antiseptic coating in preventing catheter-related infections. *Journal of Chemotherapy*. 13:56-67.
- Dosler, S. y Mataraci, E. 2013. *In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Peptides*. 49: 53-8.
- Fontana, M.B., de Bastos Mdo, C. y Brandelli, A. 2006. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Current Microbiology*. 52(5):350-3.
- Gahlot, R., Nigam, C., Kumar, V., Yadav, G. y Anupurba, S. 2014. Catheter-related bloodstream infections. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*. 4(2):162-7.
- Godoy-Santos, F., Pitts, B., Stewart, P.S. y Mantovani, H.C. 2018. Nisin penetrates *Staphylococcus aureus* biofilms but shows differences in killing effects against sessile and planktonic cells. *Biorxiv*. 303636.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. y Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113(4): 723-736.
- Inoue, H. y Minghui, R. 2017. Resistencia a los antimicrobianos: del compromiso político a la acción nacional. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. 95: 242.
- Nan, L., Yang, K. y Ren, G. 2015. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. *Material Science and Engineering C*. 51: 356-61.
- Pitiriga, V., Kanellopoulos, P., Bakalis, I., Kampos, E., Sagris, I., Saroglous, G. y Tsakris, A. 2020. Central venous catheter-related bloodstream infection and colonization: the impact of insertion site and distribution of multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 9: 189-197.
- Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina. (2017). Estudio nacional de diagnóstico institucional y prevalencia de infecciones asociadas al cuidado de la salud de hospitales de Argentina. Disponible en: www.vihda.com.ar.
- Seidi, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C. y Harris, L. 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infection and Immunity*. 76: 2044-2050.
- Sherertz, R.J., Raad, I., Belani, A., Koo, L.C., Rand, K.H., Pickett, D.L., Straub, S.A. y Fauerbach, L.L. 1990. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 76-82.
- Sparo, M.D., Castro, M.S., Andino, P.J., Lavigne, M.V., Ceriani, C., Gutiérrez, G.L., Fernández, M.M., De Marzi, M.C., Malchiodi, E.L. y Manghi, M.A. 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 123-134.
- Sparo, M.D., Jones, D.G. y Sánchez Bruni, S.F. 2009. Assessment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human Gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy*. 55: 270-7.
- Sparo, M. 2006. Investigación de bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas en el Partido de Tandil. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Wallace, A., Albadawi, H., Patel, N., Khademhosseini, A., Zhang, Y. S., Naidu, S. y Oklu, R. 2017. Anti-fouling strategies for central venous catheters. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 7(Suppl 3): S246.

Rendimiento de semilla del guar en función del distanciamiento entre surcos y densidad de población

Guar seed yield in function of row spacing and plant density

David Guadalupe Reta-Sánchez^{1*}, Juan Isidro Sánchez-Duarte², Esmeralda Ochoa-Martínez², Arturo Reyes-González²

¹ Campo Experimental Delicias. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 2 Carretera Delicias-Rosales C.P. 33000, Centro, Cd. Delicias, Chihuahua.

² Campo Experimental La Laguna. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Blvd. José Santos Valdez 1200. Col. Centro. 27440, Cd. Matamoros, Coahuila.

ABSTRACT

Guar responds to variations in row spacing and population density, however, to obtain the highest seed yield it is necessary to determine the best combination of these factors according to environmental conditions and agronomic management. The aim of the study was to determine the seed yield potential of guar in response to row spacing and plant density at the center-south region of Chihuahua. The study was carried out in Delicias, Chihuahua, during the 2021 spring-summer season. Four distances between rows (30, 45, 60 and 75 cm) and four plant densities (30, 45, 60 and 75 plants m⁻²) were evaluated. An experimental design of randomized complete blocks with three replications was used, with a 4 × 4 factorial treatment arrangement. The seed yield and its yield components were determined. There was no interaction for distance between rows x population density; a significant statistical difference was only found for row spacing. The 30-cm row spacing exceeded in seed yield (2,750 kg ha⁻¹) the other spacings (2,001 to 2,321 kg ha⁻¹), in which no differences were found between them. The highest production in rows at 30 cm was associated to its higher leaf area index, and therefore, with its higher solar radiation interception.

Key words: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub., yield components, leaf area index, solar radiation interception

RESUMEN

El guar responde a variaciones en distanciamiento entre surcos y densidad de población, sin embargo, para obtener el mayor rendimiento de semilla es necesario determinar la mejor combinación de estos factores de acuerdo con las condiciones ambientales y manejo agronómico. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial de rendimiento de semilla del guar en respuesta al distanciamiento entre surcos y la densidad de población en la región centro-sur de Chihuahua. El experimento se realizó en Delicias, Chihuahua durante el ciclo primavera-verano de 2021. Se evaluaron cuatro distanciamientos entre surcos (30, 45, 60 y 75 cm) y cuatro densidades de población (30, 45, 60 y 75 plantas m⁻²). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones, con un arreglo factorial 4 × 4 de los tratamientos. Se determinó el rendimiento de semilla y sus

componentes de rendimiento. No hubo interacción para distancia entre surcos x densidad de población; sólo se encontró diferencia significativa para el distanciamiento entre surcos. Los surcos a 30 cm superaron en rendimiento de semilla (2,750 kg ha⁻¹) a los otros distanciamientos (2,001 a 2,321 kg ha⁻¹), entre los cuales no hubo diferencia significativa. La mayor producción en surcos a 30 cm se asoció a su mayor índice de área foliar, y por lo tanto, a su mayor intercepción de radiación solar.

Palabras clave: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub., componentes del rendimiento, índice de área foliar, intercepción de radiación solar.

INTRODUCCIÓN

En la región centro-sur de Chihuahua se siembran alrededor de 50 mil hectáreas de cultivos anuales bajo irrigación durante los ciclos de primavera y verano. Los principales cultivos anuales son algodón, maíz forrajero y chile verde, con 84 % de la superficie total en 2018. Otros cultivos importantes son la cebolla, cacahuate, frijol y soya (SIAP, 2018). La región se caracteriza por una limitada e irregular disponibilidad de agua, altas temperaturas y presencia de salinidad en el suelo; problemas que en las próximas décadas se incrementarán debido al calentamiento global (Andrade y Montero, 2014). Esta situación indica que es importante aumentar la sustentabilidad de la agricultura en la región a través de una mayor diversidad de cultivos, sobre todo con especies alternativas que ofrezcan ventajas como menores requerimientos de agua, tolerancia a altas temperaturas y salinidad y una rentabilidad igual o superior a los cultivos tradicionales.

Por sus características agronómicas y su creciente uso a nivel mundial, el guar [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.] es un cultivo con alta demanda, debido a que es la principal fuente de galatomananos, que son ampliamente utilizados en diversas industrias como el procesamiento de alimentos, textiles, papeles, farmacéutica y la extracción de petróleo y gas natural (Mudgil *et al.*, 2014). El guar es un cultivo con tolerancia a salinidad (Ashraf *et al.*, 2005), sequía y altas temperaturas (Kumar, 2015), con un ciclo de 90 a 120 d, que le permite adaptarse a diferentes patrones de cultivo. Estas características indican que el guar puede integrarse en el sistema de producción agrícola de la región centro-sur de

*Autor para correspondencia: David Guadalupe Reta Sánchez
 Correo electrónico: reta.david@inifap.gob.mx

Recibido: 26 de septiembre de 2022

Aceptado: 20 de marzo de 2023

Chihuahua. Para ello es necesario determinar el potencial de rendimiento del cultivo con variaciones en el distanciamiento entre surcos y la densidad de población, dos de las prácticas agronómicas que son más importantes en la intercepción de radiación solar y la utilización de nutrientes del suelo (Reta-Sánchez *et al.*, 2016), y en gran parte determinan el potencial de rendimiento de los cultivos.

Los estudios sobre la respuesta del guar al distanciamiento entre surcos y la densidad de población muestran una gran variabilidad de acuerdo a las condiciones en que se desarrolle el cultivo. En localidades con bajo potencial de rendimiento, la densidad de población óptima en variedades con capacidad de ramificación es de 110 mil plantas ha⁻¹, mientras que en aquellas con mayor potencial, los máximos rendimientos de semilla se alcanzan a 200 mil plantas ha⁻¹ (Singh, 2014).

En la respuesta del guar al distanciamiento entre surcos, se ha observado que en surcos estrechos ocurre una mayor intercepción de radiación solar como resultado de una mejor distribución de las plantas en el terreno, situación que provoca un crecimiento del cultivo más vigoroso y mayor número de ramas, hojas y órganos reproductivos que los observados en surcos con mayor distanciamiento (Nandini *et al.*, 2017). Bajo estas condiciones ocurre una tendencia a incrementarse el rendimiento de semilla en surcos estrechos (30 cm) respecto a surcos a 45 y 60 cm (Akhtar *et al.*, 2012; Ramanjaneyulu *et al.*, 2018). El objetivo del estudio fue determinar el potencial de rendimiento de semilla del guar en respuesta al distanciamiento entre surcos y densidad de población en la región centro-sur de Chihuahua.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Campo Experimental Delicias del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, localizado en Delicias, Chihuahua, México a 28° 11' latitud norte y 105° 30' longitud oeste, con una altitud de 1178 m. La textura del suelo es franco arenoso en el estrato 0-30 cm y franco arcilloso arenoso en 30 - 60 cm. Los valores de pH y del contenido de carbonatos de Ca son altos (5.0 %), con alta disponibilidad de potasio (407 ppm) y contenidos bajos de nitrógeno (nitratos = 39 kg ha⁻¹), fósforo (10.9 ppm) y micronutrientes.

La preparación del terreno consistió de barbecho, rastreo, nivelación y trazo del experimento. La dosis de fertilización química aplicada se estimó con base en las concentraciones de N y P en la planta observada en otros estudios y una meta de rendimiento de semilla de 2.5 a 3 t ha⁻¹. Antes de la siembra, cada parcela experimental se fertilizó en forma manual con sulfato de amonio y fosfato monoamónico granulares, a razón de 50 kg N y 100 kg P₂O₅ ha⁻¹, incorporando los fertilizantes con un paso de rastra. La siembra se realizó manualmente en suelo seco el 18 de mayo de 2021. El mismo día se aplicó el riego de siembra con una lámina de 20 cm. Posteriormente, la fertilización se complementó durante el ciclo del cultivo. Antes del primer riego de auxilio se aplicó fertilización nitrogenada en dosis de 100 kg ha⁻¹ con sulfato

de amonio granulado como fuente. También se aplicó en el suelo un quelato EDDHA de hierro (Ultra ferro 6 %), en dosis de 4 kg ha⁻¹. En el segundo riego de auxilio se fertilizó con 100 kg N ha⁻¹ utilizando sulfato de amonio granulado, y además se aplicaron 50 kg ha⁻¹ de Mg con sulfato de Mg (16 % MgO).

Se evaluó la variedad de guar "Santa Cruz" establecida bajo cuatro distanciamientos entre surcos (30, 45, 60 y 75 cm) y cuatro densidades de población (30, 45, 60 y 75 mil plantas m⁻²). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones, con un arreglo factorial 4 × 4 de tratamientos, donde el factor A fueron los distanciamientos entre surcos, y el factor B, las densidades de población. Se sembró un exceso de 50 % en el número de semillas para cada tratamiento, ajustando la población de plantas con un aclareo manual realizado a los 16 días después de la siembra (dds). Las parcelas experimentales fueron de 10, 8, 6 y 6 surcos para los distanciamientos de 30, 45, 60 y 75 cm, respectivamente, con una longitud de 7 m. La parcela útil para determinar rendimiento de semilla y sus componentes fue de 4 m² de la parte central de las parcelas.

Se aplicaron dos riegos a los 31 y 69 dds, con una lámina de 18 cm. No se presentaron problemas de plagas. El control de maleza se realizó manualmente y con azadón. Se determinó semanalmente el índice de área foliar (IAF) y la intercepción de radiación solar fotosintéticamente activa en todas las parcelas del experimento. Para ello se utilizó un ceptómetro AccuPAR modelo Lp-80 PAR/LAI (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Se tomaron tres lecturas por parcela entre las 1200 y 1400 h tiempo solar. Se realizaron tres mediciones arriba y otras tres abajo del dosel, en forma paralela a la superficie del suelo. El sensor se colocó a un ángulo de 45° respecto a los surcos. Cerca del final del ciclo se aplicó el herbicida Atectra® (Dicamba) para defoliar el cultivo en dosis de 0.5 L ha⁻¹ el 25 de agosto de 2021 (99 dds).

Para determinar los componentes del rendimiento del cultivo se realizó un muestreo aleatorio de plantas de 1.6 m² en cada parcela a los 105 dds. En este muestreo se determinó el número de plantas muestreadas, número de ramas, número de racimos, además del número de vainas en tallos y ramas por parcela; posteriormente, se separaron las semillas de las vainas y se obtuvo el peso de semilla, y el peso de 1000 semillas en cada parcela. Con estos datos se determinaron los componentes del rendimiento número de vainas y semillas por planta y por m², además del número de vainas y semillas por planta. La cosecha final para determinar el rendimiento de semilla por hectárea se llevó a cabo el 13 de septiembre de 2021 (118 dds).

Se realizaron análisis de varianza ($P \leq 0.05$) para el rendimiento de semilla y sus componentes. Para comparar las medias se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa protegida de Fisher ($P \leq 0.05$). Se realizaron análisis de regresión lineal para determinar la relación entre el IAF y la intercepción de radiación solar fotosintéticamente activa máxima (IRSM) con los componentes del rendimiento y el rendimiento de semilla ($P \leq 0.05$). Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS 9.4 (SAS Institute, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clima durante el ciclo de crecimiento

Durante el ciclo de crecimiento del guar la temperatura media ambiental fluctuó de 26.1 a 24.5 °C de la siembra a la cosecha con la mayoría de las vainas en maduración (Tabla 1). La temperatura máxima fue de 35.2 a 33.2 °C, mientras que la mínima varió de 15.1 a 19.2 °C. De acuerdo con las temperaturas óptimas reportadas para guar durante la germinación (Gresta *et al.*, 2018), el crecimiento vegetativo y el reproductivo (Baath *et al.*, 2020), en el presente estudio el cultivo se desarrolló en condiciones de clima cercanas a las requeridas para un adecuado crecimiento.

Tabla 1. Factores del clima durante el desarrollo del guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población durante el ciclo primavera-verano de 2021 en Delicias, Chihuahua.

Table 1. Climate factors during the growing cycle of guar established at four row spacings and four population densities during the spring-summer cycle of 2021 in Delicias, Chihuahua.

Periodo	Temperatura (°C)			HR (%)	ET (mm)	Lluvia (mm)
	Med. max.	Med. min.	Media			
18-31 mayo	35.2	15.1	26.1	29.2	102.2	0
1-15 junio	36.5	16.9	27.4	38.4	105.2	0
16-30 junio	35.1	19.0	27.5	50.3	97.5	0
1-15 julio	32.0	19.2	25.4	71.9	87.0	28.5
16-31 julio	33.3	18.3	25.7	64.0	88.7	9.2
1-15 agosto	31.9	19.0	25.1	71.4	76.6	24.0
16-31 agosto	33.2	18.6	25.7	67.4	88.4	19.4
1-15 septiembre	33.2	15.9	24.5	60.8	81.9	1.1

Med. Max, media de máximas; Med. Min, media de mínimas; HR, humedad relativa; ET, evapotranspiración.

Características agronómicas

No se encontró diferencia significativa para la interacción densidad de población x distanciamiento entre surcos en las características agronómicas evaluadas ($P > 0.05$). Esto indica que las características agronómicas del guar presentaron un comportamiento similar en todas las densidades de población al reducir el distanciamiento entre surcos de 75 a 30 cm. En efectos principales hubo diferencias tanto para densidad de población como para distanciamientos entre surcos ($P \leq 0.05$) (Tabla 2).

El tamaño del IAF y los valores de IRSM en el estudio fueron más afectados por el distanciamiento entre surcos que por la densidad de población. Estos parámetros sólo presentaron incrementos significativos ($P \leq 0.05$) al aumentar la densidad de 30 a 45 plantas m^{-2} ; los valores observados en las densidades de 45 a 75 plantas m^{-2} fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$). En la respuesta al distanciamiento entre surcos, los valores de IAF fueron mayores en los surcos estrechos, y por lo tanto más grande su capacidad de intercepción de radiación solar ($P \leq 0.05$), dada la regresión lineal positiva observada entre el IAF y IRSM (Figura 1). El IAF en los surcos a 30 cm fue superior a los otros distanciamientos entre surcos ($P \leq 0.05$); mientras que la IRSM se redujo al aumentar la distancia entre surcos de 30 a 60 cm ($P \leq 0.05$); los valores en surcos a 75 cm fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) a

Tabla 2. Valores de probabilidad de un análisis de varianza para características agronómicas, rendimientos de semilla y sus componentes en el cultivo de guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población.

Table 2. Probability values of analysis of variance for agronomic characteristics, seed yields and their components in the guar crop established at four row spacings and four population densities.

	Significancia (valor P)		
	DS	DP	DS*DP
Rendimiento de semilla	0.0033	0.3314	0.8093
Número de vainas planta ⁻¹	0.7264	0.0001	0.7425
Número de racimos m^{-2}	0.0001	0.1835	0.2910
Número de semillas vaina ⁻¹	0.0069	0.0003	0.4025
Número de vainas m^{-2}	0.0001	0.0225	0.0494
Número de semillas m^{-2}	0.0014	0.2406	0.7220
Peso de 1000 semillas	0.7447	0.0738	0.8855
Índice de área foliar	0.0001	0.0327	0.1527
Intercepción de radiación solar	0.0001	0.0001	0.0536
Número de ramas planta ⁻¹	0.9182	0.0001	0.6077
Número de ramas m^{-2}	0.0001	0.0001	0.0644

DS = Distanciamiento entre surcos; DP = Densidad de población; DS*DP = Interacción DS*DP.

los observados en surcos a 60 cm (Tabla 3). En otros estudios realizados con canola (*Brassica napus* L.) y frijol mungo (*Vigna radiata* L.) también se ha observado en surcos estrechos (19 a 50 cm) una mayor capacidad de intercepción de radiación solar que la obtenida en surcos convencionales (76 a 100 cm) (Rachaputi *et al.*, 2015; Reta-Sánchez *et al.*, 2016).

La mayor competencia entre plantas con el aumento de la densidad de población, y un incremento muy limitado en la intercepción de radiación solar, provocó una reducción en el número de ramas por planta, número de racimos por planta y número de semillas por vaina ($P \leq 0.05$); sin embargo, el mayor número de órganos por planta en densidades bajas ($P \leq 0.05$) compensó la reducción de población de plantas, por lo que el número de ramas y racimos por m^2 fue similar en todas las densidades de población ($P > 0.05$) (Tabla 3).

En surcos estrechos con distanciamientos de 19 a 50 cm, generalmente los cultivos presentan una distribución de plantas sobre el terreno más favorable que en surcos convencionales (75 a 90 cm), con lo cual se logra una mejor explotación del dosel y espacios del suelo, además de obtener una mayor intercepción de radiación solar durante el ciclo de crecimiento (Scott *et al.*, 2013; Reta-Sánchez *et al.*, 2016). En nuestro estudio, la mayor intercepción de radiación solar en surcos estrechos (30 y 45 cm) respecto a los surcos a 60 y 75 cm ($P \leq 0.05$), favoreció una mayor producción de ramas, racimos y semillas por vaina (Tabla 4), de acuerdo con la relación positiva obtenida entre IRSM y los valores de las características agronómicas antes mencionadas (Figura 1).

Rendimiento de semilla y componentes del rendimiento

La interacción densidad de población por distanciamiento entre surcos no afectó el rendimiento de semilla y sus componentes ($P > 0.05$); sin embargo, el análisis de los efectos principales indicó diferencia significativa para los dos facto-

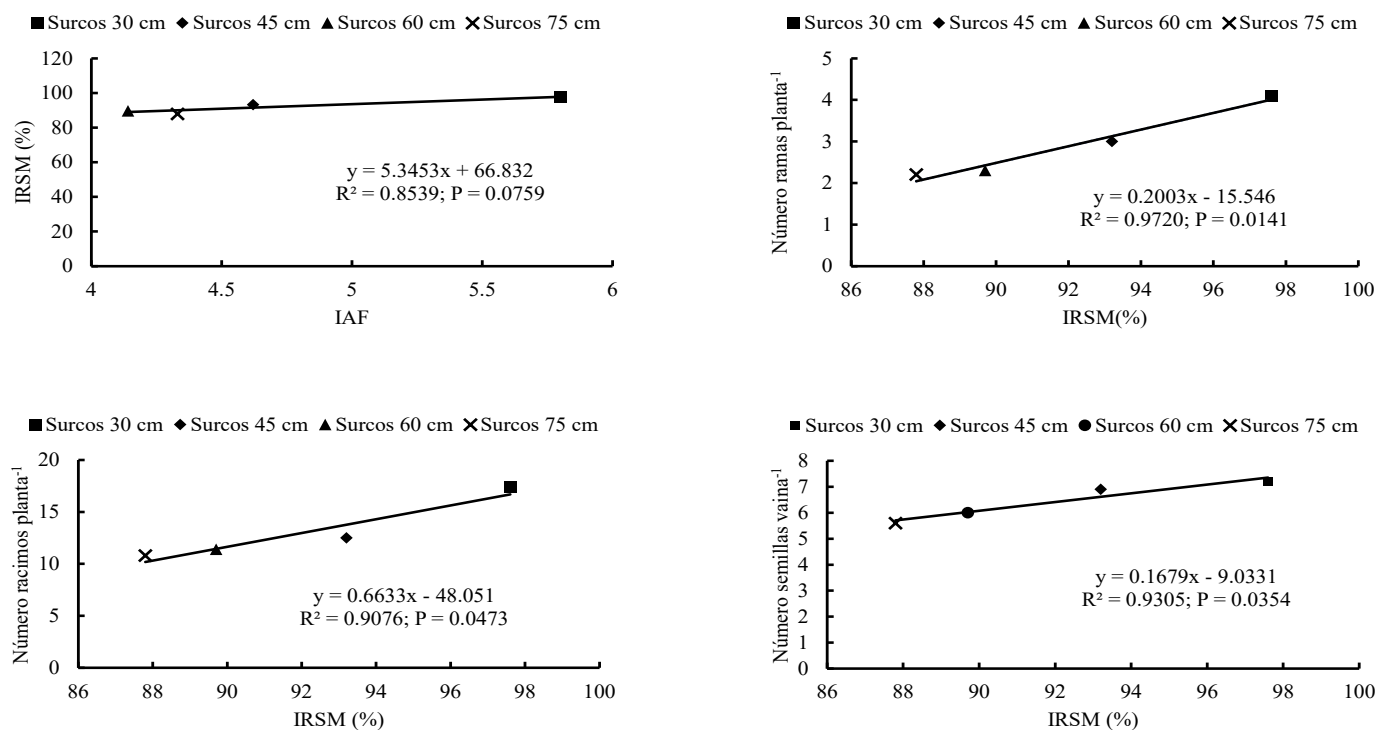


Figura 1. Relación del índice de área foliar máxima (IAF) y la intercepción de radiación solar fotosintéticamente activa máxima (IRSM) con características agronómicas del guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población.
Figure 1. Relationship of the maximum leaf area index (IAF) and the maximum photosynthetically active solar radiation interception (IRSM) with guar agronomic characteristics established at four row spacings and four population densities.

Tabla 3. Características agronómicas del cultivo de guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población.

Table 3. Agronomic characteristics of the guar crop established in four row spacings and four population densities.

Tratamiento	IAF	IRSM %	Número ramas planta ⁻¹	Número ramas m ⁻²	Número racimos planta ⁻¹	Número racimos m ⁻²	Número semillas vaina ⁻¹
Densidad de población (plantas m ⁻²)							
30	4.08 b	86.6 b	4.8 a	153.0 a	20.6 a	648.6 a	7.5 a
45	4.95 a	95.1 a	3.1 b	131.9 a	13.0 b	560.4 a	6.9 a
60	5.03 a	93.9 a	2.5 b	136.6 a	11.2 b	631.1 a	5.9 b
75	4.87 a	93.0 a	1.2 c	90.6 b	7.4 c	552.3 a	5.3 b
Distancia entre surcos (cm)							
30	5.80 a	97.6 a	4.1 a	182.5 a	17.4 a	820.3 a	7.2 a
45	4.62 b	93.2 b	3.0 b	132.2 b	12.5 b	581.6 b	6.9 ab
60	4.14 b	89.7 c	2.3 c	102.9 c	11.4 b	515.2 b	6.0 bc
75	4.33 b	87.8 c	2.2 c	94.3 c	10.8 b	475.3 b	5.6 c

‡ Medias en cada columna y para cada factor con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$). IAF = índice de área foliar máxima; IRSM = intercepción de radiación solar máxima.

res ($P \leq 0.05$). El peso de 1000 semillas no fue afectado ($P > 0.05$) por la densidad de población ni por la distancia entre surcos (Tabla 2).

El rendimiento de semilla fue estadísticamente igual ($P > 0.05$) en todas las densidades de población evaluadas, el cual fluctuó de 2,169 a 2,331 kg ha⁻¹. La diferencia nula entre densidades de población se debió a la capacidad de la planta del guar de producir mayor número de racimos por planta y semillas por vaina en las bajas densidades de población. Esta respuesta permitió a la densidad baja producir valores del número de vainas m⁻² y semillas m⁻² similares ($P > 0.05$) a los obtenidos en densidades medias y altas (Tabla 4). Resultados similares fueron observados por Mahdipour-Afra *et al.* (2021) en guar establecido en una fecha de siembra temprana, que favoreció buenas condiciones de crecimiento para el cultivo. Los datos mostraron que el número de vainas m⁻² se incrementó en las densidades de población reducidas (13 plantas m⁻²), mientras que el número de granos por vaina y peso de 100 granos no fueron afectados por la densidad de población. En las densidades de población altas (20 y 40 plantas m⁻²) la competencia por fotosintatos se intensificó entre órganos vegetativos y reproductivos. Bajo estas condiciones, se recomienda utilizar la densidad baja para maximizar el rendimiento de semilla.

En estudios previos la respuesta del guar a la densidad de población fue variable, de acuerdo principalmente a la fecha de siembra, disponibilidad de agua y nutrientes, y el cultivar utilizado. En variedades de guar con capacidad de ramificación se ha observado que las mejores densidades de población varían de 11 a 20 plantas m⁻² (Singh, 2014; Mahdipour-Afra *et al.*, 2021); mientras que en variedades sin ramificación la densidad de población óptima se incrementa a 40 plantas m⁻² (Singh, 2014). En el presente estudio se evaluaron densidades de población superiores a las densidades óptimas encontradas para variedades con ramificación bajo condiciones adecuadas de humedad y nutrientes. Los

resultados muestran que la variedad "Santa Cruz", con capacidad de ramificación, mostró la suficiente plasticidad en sus componentes del rendimiento a la variación en densidad de población de 30 a 75 plantas m⁻², por lo que los rendimientos de semilla fueron estadísticamente iguales en altas y bajas densidades (Tablas 3 y 4).

En la respuesta del guar al distanciamiento entre surcos se observó que los surcos a 30 cm superaron en rendimiento de semilla (2,750 kg ha⁻¹) a los otros distanciamientos (2,001 a 2,321 kg ha⁻¹) ($P \leq 0.05$), entre los cuales no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$). La mayor equidistancia entre plantas en surcos estrechos favoreció la producción de más racimos por planta y semillas por vaina ($P \leq 0.05$), lo cual resultó en mayor número de vainas m⁻² y semillas m⁻² en surcos estrechos ($P \leq 0.05$), especialmente en surcos a 30 cm (Tabla 4). También el mayor rendimiento de semilla en surcos a 30 cm se relacionó a su mayor IAF, y por lo tanto a su mayor capacidad de interceptación de radiación solar (Figura 2).

En otros estudios con guar se encontró también un mayor rendimiento de semilla en surcos estrechos a 30 y 45 cm respecto a los surcos a 60 cm (Akhtar *et al.*, 2012; Ramanjaneyulu *et al.*, 2018). La ventaja en surcos estrechos se origina de una distribución más equidistante entre plantas, lo cual decrece la competencia entre plantas por agua, nutrientes y radiación solar. Debido a esto, en surcos estrechos se incrementa en los cultivos la interceptación de radiación solar y la producción de biomasa (Reta-Sánchez *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2019), así como también se producen mayores rendimientos de grano (Andrade *et al.*, 2002).

Trabajos realizados a nivel mundial con guar bajo irrigación reportan buenos rendimientos de semilla, los cuales son de 2,100 a 2,400 kg ha⁻¹ (Gresta *et al.*, 2013; Avola *et al.*, 2020), con fluctuaciones de 1,240 a 3,280 kg ha⁻¹ (Sortino y Gresta, 2007). En el presente estudio, los mayores rendimientos de semilla promedio en surcos a 30 cm (2,750 kg ha⁻¹) y la fluctuación del rendimiento de 1,760 a 3,012 kg ha⁻¹, sugieren

Tabla 4. Rendimiento de semilla y sus componentes en el cultivo de guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población.

Table 4. Seed yield and its components in the guar crop established at four row spacings and four population densities.

Tratamiento	Rendimiento semilla (kg ha ⁻¹)	Número racimos planta ⁻¹	Número semillas vaina ⁻¹	Número vainas m ⁻²	Número semillas m ⁻²	Peso 1000 semillas (g)
Densidad de población (plantas m ⁻²)						
30	2,331 a	20.6 a	7.5 a	1,670 a	7,813 a	29.0 a
45	2,505 a	13.0 b	6.9 a	1,536 ab	7,765 a	30.0 a
60	2,256 a	11.2 b	5.9 b	1,724 a	7,571 a	29.8 a
75	2,169 a	7.4 c	5.3 b	1,345 b	6,645 a	30.1 a
Distancia entre surcos (cm)						
30	2,750 a	17.4 a	7.2 a	2,295 a	8,955 a	29.5 a
45	2,321 b	12.5 b	6.9 ab	1,492 b	7,719 ab	29.6 a
60	2,188 b	11.4 b	6.0 bc	1,280 bc	6,753 bc	29.9 a
75	2,001 b	10.8 b	5.6 c	1,208 c	6,367 c	29.9 a

† Medias en cada columna y para cada factor con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS $P \leq 0.05$).

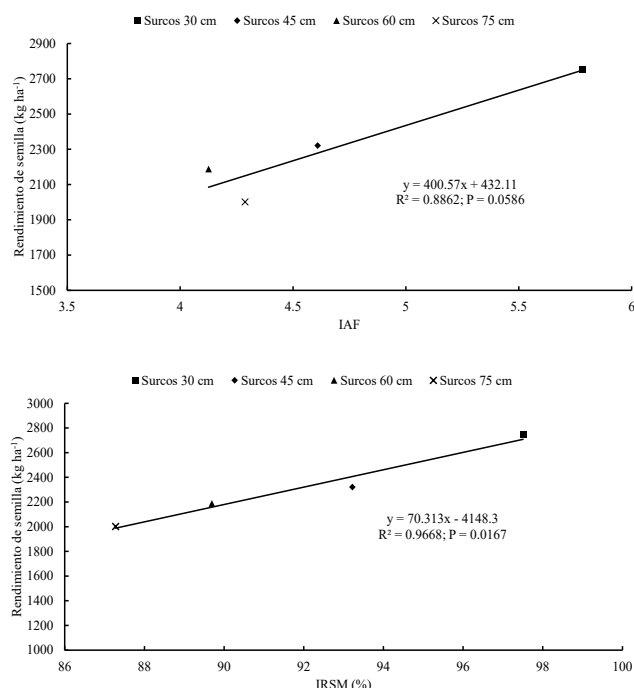


Figura 2. Relación del índice de área foliar máximo (IAF) e intercepción de radiación solar fotosintéticamente activa máxima (IRSM) con los rendimientos de semilla del guar establecido en cuatro distanciamientos entre surcos y cuatro densidades de población.

Figure 2. Relationship of maximum leaf area index (IAF) and maximum photosynthetically active solar radiation interception (IRSM) with guar seed yields established at four row spacings and four population densities.

que el potencial de rendimiento del guar en la región puede ser igual o superior a 3000 kg ha^{-1} , si se aplica un buen manejo agronómico y se establece en un suelo de mediana a buena fertilidad.

Los resultados indican que los mayores rendimientos en guar se obtienen con la siembra en surcos a 30 cm. Sin embargo, este método de siembra no permite el paso de maquinaria para realizar prácticas agronómicas como el control de maleza, aplicación de fraccionada de fertilizantes y aplicaciones de pesticidas durante el ciclo de crecimiento. Para utilizar surcos estrechos se requiere generar tecnología de producción o bien evaluar métodos de siembra con surcos estrechos, pero que permitan el paso de maquinaria, como camas con varias hileras. También se puede utilizar surcos a 60 y 75 cm, que permitan el trabajo de maquinaria tradicional, pero con pérdidas en rendimiento de semilla entre 20.4 y 27.2 %.

CONCLUSIONES

El guar presentó un buen potencial de producción de semilla en la región centro-sur de Chihuahua, con los mejores rendimientos promedio en los surcos estrechos a 30 cm de espaciamiento ($2,750 \text{ kg ha}^{-1}$), mientras que en densidades de población el cultivo produjo rendimientos similares en densidades de población entre 30 y 75 plantas m^{-2} . El mayor rendimiento de semilla en surcos a 30 cm se asoció a su mayor índice de área foliar, y por lo tanto, con una mayor intercepción de radiación solar.

REFERENCIAS

- Akhtar, L.H., Shahjhan B., Salah-ud-Din, S. y Rashid, M. 2012. Response of new guar strains to various row spacings. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 49(4): 469-471.
- Andrade, F.H., Calviño, P., Cirilo, A. y Barbieri, P. 2002. Yield responses to narrow rows depend on increased radiation interception. *Agronomy Journal*. 94: 975-980. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.9750>
- Andrade V.M. y Montero, M.M.J. 2014. Nuevas proyecciones de cambio de precipitación y temperatura para el siglo XXI en el Norte de México. E. Herrera, M. López, J. Carrillo (eds.). *Memorias del segundo congreso cambio climático del Estado de Chihuahua*. Primera edición. pp:26-35.
- Ashraf, M.Y., Akhtar, K., Sarwar, G. y Ashraf, M. 2005. Role of rooting system in salt tolerance potential of different guar accessions. *Agronomy for Sustainable Development*. 25: 243-249. <https://doi.org/10.1051/agro:2005019>
- Avola, G., Riggi, E., Trostle, C., Sortino, O. y Gresta, F. 2020. Deficit irrigation on guar genotypes (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub): effects on seed yield and water use efficiency. *Agronomy*. 10: 789. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060789>
- Baath, G.S., Kakani, V.G., Gowda, P.H., Rocateli, A.C., Northup B.K., Singh, H. y Katta, J.R. 2020. Guar responses to temperature: Estimation of cardinal temperatures and photosynthetic parameters. *Industrial Crops and Products*. 2020, 145, 111940. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111940>
- Feng, L., Raza, M.A., Chen, Y., Khalid, M.H.B., Meraj, T.A., Ahsan, F., Fan, Y., Du, J., Wu, X., Song, C., Liu, C., Bawa, G., Zhang, Z., Yuan, S., Yang, F. y Yang, W. 2019. Narrow-wide row planting pattern improves the light environment and seed yields of intercrop species in relay intercropping system. *PLoS ONE*. 14(2): e0212885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212885>.
- Gresta, F., Cristaudo, A., Trostle, C., Anastasi, U., Guarnaccia, P., Catara, S. y Onofri A. 2018. Germination of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub.) genotypes with reduced temperature requirements. *Aust. J. Crop. Sci.* 12: 954-960. DOI: [10.21475/ajcs.18.12.06.PNE1049](https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.06.PNE1049)
- Gresta, F., Sortino, O., Santonoceto, C., Issi, L., Formantici, C. y Galante, Y.M. 2013. Effects of sowing times on seed yield, protein and galactomannans content of four varieties of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products*. 41:46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.007>
- Kumar, D. 2015. Guar. Status, potential, prospects, challenges and R & D road map. *Toward boosting exports. Technology Information, Forecasting and Assessment Council*. 38 p.
- Mahdipour-Afra M., AghaAlikhani, M., Abbasi, S. y Mokhtassi-Bidgoli, A. 2021. Growth, yield and quality of two guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) ecotypes affected by sowing date and planting density in a semi-arid area. *PLoS ONE* 16(9): e0257692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257692>
- Mudgil, D., Barak, S. y Khatkar, B.S. 2014. Guar gum: processing, properties and food applications – A review. *Journal of Food Technology*. 51:409-418. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0522-x>.
- Nandini, K.M., Sridhara, S., Shivanand Patil y Kiran Kumar. 2017. Effect of planting density and different genotypes on growth, yield and quality of guar. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. 5(1):320-328. <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.2499>

- Ramanjaneyulu, A.V., Madhavi, A., Neelima, T.L., Naresh, P., Indudhar Reddy, K. y Srinivas, A. 2018. Effect of row spacing and sowing time on seed yield, quality parameters and nutrient uptake of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub) in semi arid climate of southern Telanagana, India. *Legume Research* 41(2):287-292. DOI:10.18805/lr.v0i0.7599
- Rachaputi, R.C.N., Chauhan, Y., Douglas, C., Martin, W., Krosch, S., Agius, P. y King, K. 2015. Physiological basis of yield variation in response to row spacing and plant density of mungbean grown in subtropical environments. *Field Crops Research* 183:14-22. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.07.013>.
- Reta-Sánchez, D.G., Serrato-Corona, J.S., Quiroga-Garza, H.M. y Gaytán-Mascorro, U. 2016. Forage yield and chemical composition of canola (*Brassica napus* L.) as affected by sowing methods. *Grass and Forage Science*. 71(2):281-290. <https://doi.org/10.1111/gfs.12174>
- SAS Institute. 2011. The SAS system for windows, release 9.3. Statistical Analysis Systems Inst., Cary, NC.
- Scott, B.J., Martin P. y Riethmuller, G.P. 2013. Row spacing of winter crops in broad scale agriculture in southern Australia. *Graham Centre onograph No. 3. State of New South Wales through Department of Trade and Investment*. pp. 94.
- SIAP (Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Acciones y Programas. Cierre de la producción agrícola. Gobierno de México.
- Singh, S.K. 2014. An analysis of guar crop in India 2013-2014. CCS National Institute of Agricultural Marketing. United States Department of Agriculture. 100 p.
- Sortino, O. y Gresta, F. 2007. Growth and yield performance of five guar cultivars in a Mediterranean environment. *Italian Journal of Agronomy/ Riv. Agron.* 4:359-364. DOI:10.4081/ija.2007.359



Estabilidad dinámica de miembros inferiores y estabilidad central en basquetbolistas con y sin discapacidad auditiva

Dynamic stability of lower limbs and core stability in basketball players with and without hearing impairment

Olga Lucía Hincapié-Gallón¹, Lina Marcela Tierradentro-Gómez², Daniela Bravo-Romero³ y Nathalia Córdoba-Peña⁴

¹ Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte (Facultad de Salud y Rehabilitación), Valle del Cauca. Cali, Colombia. Correo electrónico: olga.hincapie@endeporte.edu.co

² Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte (Facultad de Salud y Rehabilitación), Valle del Cauca. Cali, Colombia. Lina.tierradentro00@endeporte.edu.co

³ Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte (Facultad de Salud y Rehabilitación), Valle del Cauca. Cali, Colombia. Daniela.bravo1@endeporte.edu.co

⁴ Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte (Facultad de Salud y Rehabilitación), Valle del Cauca. Cali, Colombia. Nathalia.cordoba00@endeporte.edu.co

RESUMEN

Introducción: La estabilidad dinámica es la habilidad de conservar una condición estable estática sobre una base de sustentación luego de una transición dinámica, razón por la cual, es relevante en el baloncesto por los cambios de dirección, aceleración y desaceleración, situaciones a las cuales se deben enfrentar los deportistas. **Objetivo:** Identificar características relacionadas con la estabilidad dinámica de miembros inferiores en basquetbolistas con y sin discapacidad auditiva. **Método:** Estudio descriptivo en deportistas con y sin discapacidad auditiva entre los 18 a 45 años de edad del Valle del Cauca. Se evaluaron variables sociodemográficas, clínicas, antropométricas, antecedentes, estabilidad dinámica con el Test de la Y y estabilidad central con el protocolo de McGill. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas en la variable de estabilidad dinámica en los deportistas con y sin discapacidad auditiva, sin embargo, 2 deportistas, con y sin discapacidad auditiva obtuvieron un compuesto por encima del promedio. Para la variable de estabilidad central se obtuvo mayores tiempos en la prueba de decúbito lateral izquierdo que en el derecho, siendo este su lado dominante. **Conclusión:** Los resultados diversos invitan a mantener el principio de individualización en la evaluación y abordaje de los deportistas.

Palabras clave: Baloncesto, Persona con discapacidad, Pérdida auditiva, Estabilidad central, Equilibrio postural.

ABSTRACT

Introduction: Dynamic stability is the ability to preserve a static stable condition on a sustaining base after a dynamic transition, therefore, it is relevant in basketball due to changes in direction, acceleration and deceleration, a fact that affects both hearing impaired and non-hearing impaired athletes. **Aim:** To identify characteristics related to dynamic stability of lower limbs in basketball players with and without hearing impairment. **Methods:** Descriptive study in athletes with and without hearing impairment between 18 and 45

years of age from Valle del Cauca. Sociodemographic, clinical and anthropometric variables, history, dynamic stability with the Y test and core strength with the McGill protocol were evaluated. **Results:** No significant differences were found in the dynamic stability variable in athletes with nor without hearing impairment, however, 2 athletes, with and without hearing impairment obtained a composite above the average. For the core muscle resistance variable, longer times were obtained in the left lateral decubitus test than in the right lateral decubitus test, this being their dominant side. **Conclusion:** The diverse results invite us to maintain the principle of individualization in the evaluation and approach to athletes.

Keywords: Basketball, Disabled Persons, Hearing Loss, Core Stability, Postural balance.

INTRODUCCIÓN

El deporte tiene una gran tarea en la inclusión de los deportistas con discapacidad, por lo que se hace necesario realizar ajustes para el desarrollo de la práctica deportiva desde un abordaje integral que favorezca las igualdades que permita la participación del mismo, ya que, el deporte es una herramienta que contribuye al desarrollo social de las personas y a la adquisición de estilos de vida saludables (Kizar *et al.*, 2021).

En cuanto al baloncesto, la práctica tanto en personas con y sin discapacidad auditiva, no se presentan diferencias marcadas, salvo a algunas modificaciones, como es el caso de la implementación de ayudas visuales para las personas con discapacidad auditiva (Uchida *et al.*, 2017), lo que evidencia el papel que juega la individualización como principio relevante del entrenamiento deportivo para el desarrollo del mismo (Bernal-Reyes *et al.*, 2014).

Por otro lado, la estabilidad también podría verse altamente influenciada por el estado en el que se encuentren los músculos centrales o del core (Sasaki *et al.*, 2019), puesto que, estos modifican el control neuromuscular del tronco y extremidades inferiores, proporcionando tanto estabilidad como movilidad al cuerpo, lo que se convertiría en un predictor de

*Autor para correspondencia: Lina Marcela Tierradentro Gómez
Correo electrónico: lina.tierradentro00@endeporte.edu.co

Recibido: 30 de diciembre de 2022
Aceptado: 21 de marzo de 2023

riesgo de lesión (Huxel Bliven *et al.*, 2013); este componente es esencial en cuanto a la evaluación, prevención y rehabilitación de lesiones en los deportistas con y sin discapacidad auditiva (Akinoğlu *et al.*, 2018).

Por último, cabe resaltar que las investigaciones en deportistas con discapacidad auditiva son limitadas, por lo cual se sugiere que las variables identificadas en este estudio sean utilizadas como referencias iniciales para abordar el abordaje deportivo partiendo desde la evaluación de las características anteriormente mencionadas identificando la presencia o no de factores diferenciales en ambas poblaciones, teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente estudio es describir las características relacionadas con la estabilidad dinámica de miembros inferiores en deportistas de baloncesto con y sin discapacidad auditiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, el cual contó con la participación de 4 deportistas con discapacidad auditiva y 4 sin discapacidad auditiva del Valle del Cauca entre los 18 y 45 años de edad. Se excluyeron deportistas con lesiones 6 meses anteriores a la toma de mediciones y quienes tuviesen antecedentes de enfermedades neurológicas.

Procedimiento

Para la recolección de datos sociodemográficos se seleccionó el cuestionario donde se tienen en cuenta diferentes variables tales como la edad, estrato socioeconómico y datos relacionados con antecedentes de lesiones en miembros inferiores.

Para la estabilidad dinámica en miembros inferiores se seleccionó el Test de Y, el cual cuenta con una escala de 0 a 3, un valor de 3 a nivel del protocolo, objetividad, fiabilidad y validez, por lo cual, es el ideal para medir la capacidad del equilibrio, además de esto, es de fácil aplicación, sencillo y muy útil que proporciona medidas importantes que cumplen con el objetivo planteado en el estudio (Alsehre *et al.*, 2021).

Por otro lado, para los resultados de esta prueba se recolectaron las distancias alcanzadas para cada dirección de los 3 intentos y se promediaron para así, finalmente obtener el valor normalizado representado en porcentaje (%) con la siguiente fórmula: $(\text{Distancia alcanzada} / \text{Longitud de la pierna}) \times 100\%$ (Alsehre *et al.*, 2021).

Para la evaluación de la estabilidad central se utilizó el protocolo de McGuill, siendo este uno de los test más utilizados por diversas investigaciones para medir esta variable en deportistas, en el componente de resistencia muscular. Este protocolo ha demostrado ser fiable y posee suficiente validez para ser utilizado ampliamente en diversas investigaciones (Peña *et al.*, 2012). Además de esto, se tomaron variables antropométricas como peso, talla para finalmente obtener el índice de masa corporal (IMC).

Aspectos éticos

La presente investigación cuenta con aprobación del Comité de Ética de la Institución Universitaria Escuela Nacional del Deporte, con memorando número 17.260. Es un estudio considerado como de riesgo mínimo según el artículo 11 de la resolución 008430 del 1993.

Los deportistas participaron de manera voluntaria aceptando la misma a través de un consentimiento informado en donde se estableció que aceptaban el uso de información recopilada durante el estudio de manera voluntaria y que fueron informados acerca de los procesos a realizar a lo largo del proyecto, las pruebas a realizar y los riesgos que presentan.

De igual manera, se mantuvo confidencialidad con respecto a los datos brindados por los participantes, por lo tanto, la base de datos no contenía nombres o documentos de identificación que permitiera el reconocimiento de los participantes.

Análisis estadístico

Se recolectó la información y se evaluaron las diferentes variables las cuales fueron codificadas en el sistema SPSS y Excel en donde se realizó el análisis de los datos y sus resultados. Los resultados se presentarán de manera escrita y semitabular. A las variables de estabilidad dinámica de miembros inferiores y estabilidad central se realizó la Prueba de U de Mann-Whitney con un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se evidencia que el deportista 1, sin discapacidad auditiva, presenta como antecedente ruptura de ligamento cruzado anterior y, adicionalmente, un índice de masa corporal de 29,7 kg/m², lo cual, lo cataloga como una persona con sobrepeso. Por otro lado, el deportista 7, presentó una discapacidad auditiva desde el nacimiento, quien, además presentó una baja frecuencia de entrenamiento con 3 h/sem y además, un índice de masa corporal (IMC) que representa sobrepeso, quien, adicionalmente, presentó un resultado bajo en el compuesto de estabilidad dinámica tanto de miembro inferior derecho como izquierdo.

En relación con lo anterior, Hartley *et al.* (2018) encontraron que un IMC elevado se encontraba asociado a un mayor riesgo de lesiones de esguince de tobillo. Es de resaltar que los deportistas 3 y 4 con discapacidad auditiva, presentaron antecedentes de lesiones relacionados con el ámbito laboral, por el contrario, los deportistas sin discapacidad auditiva, lesiones relacionadas con el deporte.

En la estabilidad dinámica de miembro inferior (Tabla 2), no se encontraron diferencias significativas tanto derecha como izquierda ($p = 0,886$) en el compuesto entre deportistas con y sin discapacidad auditiva. Esto relacionado con lo evidenciado por Plisky *et al.* (2006), en donde menciona que con compuesto $\leq 89,6\%$ se tiene un 6,5 % más de posibilidad de lesión en miembros inferiores, lo cual, en relación al presente

Tabla 1. Descripción de los casos de acuerdo con las características sociodemográficas, clínicas, antropométricas y propias del entrenamiento.**Table 2.** Cases description according to the sociodemographic, clinical, anthropometry and training characteristics.

Características	Sin discapacidad auditiva (n=4)				Con discapacidad auditiva (n=4)			
	S1	S2	S5	S6	S3	S4	S7	S8
Sociodemográficas								
Género	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino
Edad (Años)	36	18	40	36	44	38	45	19
Estrato socioeconómico	4	4	3	3	1	1	2	1
Nivel de escolaridad	Profesional	Bachiller	Técnica	Profesional	Técnica	Bachiller	Primaria completa	Bachiller
Clínicas								
Tiempo de pérdida auditiva	-	-	-	-	>40 años	20-30 años	Desde el nacimiento	Desde el nacimiento
Antecedentes de diagnóstico osteomuscular	Ruptura de LCA	Esguince de rodilla	No aplica	No aplica	Lumbalgia	Lumbalgia	No aplica	No aplica
Antecedente de cirugía osteomuscular	Reconstrucción de LCA	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica
Antecedente de lesión más importante debido al entrenamiento	Rodilla (Ligamento)	Rodilla (Ligamento)	Rodilla (Ligamento)	No aplica	Muslo (Muscular)	No aplica	No aplica	No aplica
Propias del entrenamiento								
Frecuencia de entrenamiento (Horas a la semana)	6	10	18	12	6	6	3	18
Antropométricas								
Talla (m)	1,84	1,85	1,65	1,63	1,72	1,78	1,55	1,59
Peso (kg)	99,4	87,8	71,5	59,4	78,3	78,3	71	54,7
IMC (m/kg²)	29,7*	25,7	26,3*	22,4	26,6*	24,7	29,6	21,6

T(s): Segundos, (m): metros, (kg): kilogramos. (*) IMC elevado con sobrepeso.

estudio, supondría un elevado riesgo de lesiones, debido a que de los ocho sujetos evaluados, el deportista 8 presentó valores superiores al 89,6 % en el compuesto derecho con un 103,93 % y 108,1 % para el compuesto izquierdo a pesar de presentar discapacidad auditiva, mientras que solo uno de los deportistas sin discapacidad auditiva, el sujeto 1, superó este valor con un 90,27 % y 91,37 % para el compuesto derecho e izquierdo.

Asimismo, se evidenció que la asimetría en la dirección anterior mayor a 4 cm, estaba asociado a lesiones sin contacto, en donde se halló que el sujeto 4 y 5 sobrepasaban esta diferencia con 4,24 y 6,76 cm respectivamente, presentando así, un mayor riesgo de lesión.

Finalmente, para la estabilidad central no se encontraron diferencias significativas en la prueba de tiempo de decúbito prono ($p = 0,886$), decúbito lateral derecho ($p=1$), izquierdo ($p = 0,114$) y flexores de tronco ($p = 0,114$) teniendo en cuenta los valores presentados por Peña *et al.* (2012).

Es importante resaltar el caso del deportista 7, quien presentó una estabilidad dinámica deficiente con un compuesto derecho de 71,6 % y 74,14 % para el izquierdo, quien adicionalmente obtuvo una diferencia mayor a los 4 centímetros entre ambas extremidades en la dirección anterior, lo

cual se encuentra relacionado a un mayor riesgo de lesión. Por otro lado, en la estabilidad central alcanzó la duración más alta con 100 segundos para decúbito prono, 33 y 44 seg para decúbito lateral derecho e izquierdo respectivamente, y 33 seg para flexores de tronco. Esto en relación con lo evidenciado por Suarez *et al.* (2007), en donde, menciona que el sistema nervioso central se adapta a la privación del sentido, mediante el uso de estrategias sustitutivas, en este caso, un aumento de la estabilidad central.

Lo anterior evidencia que la tendencia de los deportistas con discapacidad auditiva es a fortalecer otros aspectos físicos para sopesar la falta del estímulo auditivo, sin embargo, aún presentan una estabilidad dinámica deficiente lo que puede estar en relación al sobrepeso y baja carga de entrenamiento semanal.

Por otro lado, el sujeto 2, deportista sin discapacidad auditiva obtuvo un menor desempeño en la estabilidad dinámica de miembros inferiores con un compuesto de 61,4 % y 62,4 % para la extremidad derecha e izquierda respectivamente, quien adicionalmente, en la estabilidad central alcanzó el menor tiempo. Esto, en relación con que el deportista presenta un índice de masa corporal con sobrepeso y adicionalmente, lesión de rodilla de tipo ligamentaria lo

Tabla 2. Descripción de los casos de acuerdo con la estabilidad dinámica de miembro inferior derecho e izquierdo y estabilidad central.

Table 2. Cases description according to right and left lower limb dynamic stability and core stability.

Características		Sin discapacidad auditiva (n=4)				Con discapacidad auditiva (n=4)			
		S1	S2	S5	S6	S3	S4	S7	S8
Estabilidad dinámica de miembro inferior derecho	Anterior (VN%)	75,61	70,55	75,67	76,77	78,47	72,68	66,89	87,23
	Posteromedial (VN%)	89,43	50,84	82,38	70,36	60,55	77,21	61,83	94,81
	Posterolateral (VN%)	92,24	66,66	74,28	79,59	61,35	79,96	62,69	92,34
	Compuesto (VN%)	90,27*	61,45	85,10	83,04	69,93	78,18	71,68	103,93*
Estabilidad dinámica de miembro inferior izquierdo	Anterior (VN%)	77,29	66,83	74,68	74,17	77,22	77,04	75,03	88,23
	Posteromedial (VN%)	93,33	54,01	76,90	70,87	60,24	79,65	66,43	91,91
	Posterolateral (VN%)	92,53	70,35	82,47	81,35	64,68	82	54,28	102,4
	Compuesto (VN%)	91,37*	62,48	85,26	82,92	70,18	81,18	74,14	108,1*
Diferencias entre extremidad derecha e izquierda	Anterior (cm)	2,37	3,8	0,53	2,36	1,2	4,26*	6,76*	0
	Posteromedial (cm)	4,63	3,23	4,6	2,13	0,3	2,4	3,43	3,46
	Posterolateral (cm)	1,2	3,83	7,86	1,7	3,2	2	7,93	7,9
Estabilidad central	Decúbito prono (s)	94	23,7	78	70	33	45	100	60
	Decúbito lateral derecho (s)	30	17,4	37	30	31	30	33	29
	Decúbito lateral izquierdo (s)	30	20	38	40	44	31	44	44
	Flexores de tronco (s)	18	9	36	31	39	33	56	33

VN: Valor normalizado de acuerdo a la distancia alcanzada y longitud real de miembro inferior, (cm): Centímetros, (s): Segundos. (*) Diferencia mayor a los 4 centímetros: Mayor riesgo de lesión de miembros inferiores.

que afecta de manera directa su estabilidad dinámica. Esto, relacionado con un estudio realizado por Holder H (2000), en donde se evaluó si había disminución en el balance después de una lesión osteomuscular, se encontró que, en los sujetos con antecedentes de lesiones de miembro inferior, el balance se mantiene deteriorado y no vuelve al nivel de estabilidad de la extremidad no lesionada.

CONCLUSIONES

Se concluye que, no se encontraron diferencias significativas en los casos evaluados en cuanto a la estabilidad dinámica en deportistas con y sin discapacidad auditiva. Sin embargo, se identificó que los deportistas con mayores IMC presentaban un bajo nivel de estabilidad dinámica, reforzando la importancia de reconocer siempre el principio de la individualización en el entrenamiento deportivo.

En cuanto a los antecedentes de lesiones, estos evidenciaron a una disminución en el control propioceptivo y neuromuscular, lo que influye en la estabilidad dinámica, lo cual es dependiente de cada deportista.

Por otro lado, se evidencia que la evaluación de la estabilidad dinámica y estabilidad central se hace igual de relevante tanto para el deportista con y sin discapacidad au-

ditiva, lo que evidencia la importancia del análisis individual para la toma de decisiones de acuerdo con las singularidades del ser humano teniendo en cuenta las capacidades y de esta manera dar respuesta a las normativas en relación con la población con discapacidad.

CONFLICTOS DE INTERESES

Manifiesto que el trabajo arriba mencionado es original de nuestra autoría, acepto que he contribuido a su producción y no contiene material protegido por derechos de reproducción, ni genera conflicto de intereses por lo cual me hago responsable de su contenido.

REFERENCIAS

Akinoğlu, B. y Kocahan, T. 2018. Comparison of muscular strength and balance in athletes with visual impairment and hearing impairment. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 14(5): 765.

Alshehre, Y., Alkhatami, K., Brizzolara, K., Weber, M. y Wang-Price, S. 2021. Reliability and Validity of the Y-balance Test in Young Adults with Chronic Low Back Pain. *International Journal of Sports Physical Therapy*. 16(3):628-35.

- Bernal-Reyes, F., Peralta-Mendivil, A., Gavotto-Nogales, H.H. y Placencia-Camacho, L. 2014. Principios de entrenamiento deportivo para la mejora de las capacidades físicas. *Biotecnia*. 16(3): 42-49.
- Hartley, E. M., Hoch, M.C. y Boling, M.C. 2018. Y-balance test performance and BMI are associated with ankle sprain injury in collegiate male athletes. *Journal of science and medicine in sport*. 21(7): 676-680.
- Holder-Powell, H.M. y Rutherford, O.M. 2000. Unilateral lower-limb musculoskeletal injury: its long-term effect on balance. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 81(3):265-8.
- Huxel Bliven, K.C. y Anderson, B.E. 2013. Core stability training for injury prevention. *Sports health*. 5(6):514-522.
- Kızar, O., Demir, G.T. y Genç, H. 2021. Examination of the effect of national and amateur disabled athletes' disability types on sports participation motivation. *European Journal of Physical Education and Sport Science*. 6(12).
- Peña, G., Heredia Elvar, J.R., Moral, S., Isidro Donate, F. y Mata Ordoñez, F. 2012. Revisión de los métodos de valoración de la estabilidad central (CORE). *PubliCE Standard*.
- Plisky, P.J., Rauh, M.J., Kaminski, T.W. y Underwood, F.B. 2006. Star Excursion Balance Test as a predictor of lower extremity injury in high school basketball players. *Journal of orthopaedic & sports physical therapy*. 36(12): 911-919.
- Saraswat, A., Malhotra, D. y Sivaram, C. 2015. Effect of dynamic balance training on agility in male basketball players. *International Journal of Physiotherapy*. 2(5):798-803.
- Sasaki, S., Tsuda, E., Yamamoto, Y., Maeda, S., Kimura, Y., Fujita, Y. y Ishibashi, Y. 2019. Core-muscle training and neuromuscular control of the lower limb and trunk. *Journal of athletic training*. 54(9): 959-969.
- Suarez, H., Angeli, S., Suarez, A., Rosales, B., Carrera, X. y Alonso, R. 2007. Balance sensory organization in children with profound hearing loss and cochlear implants. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 71(4): 629-637.
- Szymczyk, D., Drużbicki, M., Dudek, J., Szczepanik, M. y Snela, S. 2012. Balance and postural stability in football players with hearing impairment. *Balance*. 3: 258-263.
- Uchida, T., Miyazaki, T., Azuma, M., Umeda, S., Kato, N., Sumiyoshi, H. y Hiruma, N. 2017. Sign language support system for viewing sports programs. In *Proceedings of the 19th International ACM SIGACCESS Conference on Computers and Accessibility*. 339-340.
- Wikstrom, E.A., Tillman, M.D., Smith, A.N. y Borsa, P.A. 2005. A new force-plate technology measure of dynamic postural stability: the dynamic postural stability index. *Journal of athletic training*. 40(4): 305.



Análisis bibliométrico de la literatura científica sobre el abono orgánico Bokashi: alternativa en la agricultura sostenible

Bibliometric analysis of scientific literature on the Bokashi organic fertilizer: alternative in sustainable agriculture

González-Rodríguez Gabriela¹, Preciado-Rangel Pablo², Lizárraga-Bernal Christian Guadalupe³, Espinosa-Palomeque Bernardo^{3*}

¹ Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco 56230, México.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera Santa Fe s/n, colonia Valle Verde 27010. Torreón, Coahuila, México.

³ Universidad Tecnológica de Escuinapa, Camino al Guasimal, s/n colonia Centro. 82400. Escuinapa de Hidalgo, Sinaloa, México.

RESUMEN

El uso Bokashi como enmienda orgánica del suelo y fuente de nutrición para las plantas ha recibido una atención considerable en los últimos años. El Bokashi es un método de compostaje de origen japonés, basado en la fermentación aeróbica de los residuos mediante la inoculación de microorganismos eficientes; que son bacterias anaeróbicas y levaduras lácticas que aceleran el proceso acortando el tiempo de obtención del abono. El objetivo de la investigación fue caracterizar la producción científica mundial sobre el abono Bokashi indexada en la base de datos SCOPUS. El proceso se realizó el 10 de agosto de 2022 mediante el algoritmo de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (Bocashi) OR TITLE-ABS-KEY (Bokashi)) vinculado a título del artículo, resumen y palabras claves. La investigación se realizó utilizando el instrumento de investigación de los softwares VOSviewer y Harzing's Publish or Perish. Los resultados del análisis bibliométrico registraron un total de 161 documentos publicados entre los años 1999 a 2022. Las principales tipologías de las publicaciones fue 129 artículos (80.12 %) y 25 conferencias (15.52 %), el 87.58 % (141 publicaciones) fueron en inglés. Brasil fue el país como más publicaciones (39), seguido por Indonesia (31) y México (22). Ventura, M. U. fue el autor con mayor productividad con seis artículos. En las redes de coautorías se encontraron dos redes principales: la primera con Fregonezi, G. A. F., Hata, F. T. y Ventura, M. U. y, la segunda, con Grądzki, Z. El interés crecimiento del Bokashi como alternativa sostenible en los sistemas de producción agrícolas debe permitir establecer y construir redes de publicaciones científicas, revistas científicas, investigadores, organización de investigación, países y palabras claves.

Palabras claves: abono fermentado, microorganismos efectivos, SCOPUS, VOSviewer.

ABSTRACT

The use of Bokashi as an organic soil amendment and a source of plant nutrition has received considerable attention in recent years. Bokashi, is a composting method of Japanese origin, based on the aerobic fermentation of waste through the inoculation of efficient microorganisms, which are anaerobic bacteria and lactic yeasts that accelerate the process, shortening the time it takes to obtain the fertilizer. The objective of the research was to characterize the world scientific production on Bokashi fertilizer indexed in the SCOPUS database. The process was carried out on August 10, 2022 using the search algorithm: (TITLE-ABS-KEY (Bocashi) OR TITLE-ABS-KEY (Bokashi)) linked to article title, abstract and keywords. The research was carried out using the research instrument of the VOSviewer and Harzing's Publish or Perish software. The results of the bibliometric analysis recorded a total of 161 documents published between the years 1999 and 2022. The main types of publications were 129 articles (80.12 %) and 25 conferences (15.52 %), 87.58 % (141 publications) of which, were in English. Brazil was the country with the most publications (39), followed by Indonesia (31) and Mexico (22). Ventura, M. U. was the highest producing author with six articles. In the co-authorship networks, two main networks were found: the first with Fregonezi, G. A. F., Hata, F. T. and Ventura, M. U. and the second with Grądzki, Z. The growing interest in Bokashi as a sustainable alternative in agricultural production systems should allow to establish and build networks of scientific publications, scientific journals, researchers, research organization, countries and keywords.

*Autor para correspondencia: Bernardo Espinosa Palomeque
Correo electrónico: berna_palomeque@outlook.com

Recibido: 12 de septiembre de 2022

Aceptado: 13 de abril de 2023

robic bacteria and lactic yeasts that accelerate the process, shortening the time it takes to obtain the fertilizer. The objective of the research was to characterize the world scientific production on Bokashi fertilizer indexed in the SCOPUS database. The process was carried out on August 10, 2022 using the search algorithm: (TITLE-ABS-KEY (Bocashi) OR TITLE-ABS-KEY (Bokashi)) linked to article title, abstract and keywords. The research was carried out using the research instrument of the VOSviewer and Harzing's Publish or Perish software. The results of the bibliometric analysis recorded a total of 161 documents published between the years 1999 and 2022. The main types of publications were 129 articles (80.12 %) and 25 conferences (15.52 %), 87.58 % (141 publications) of which, were in English. Brazil was the country with the most publications (39), followed by Indonesia (31) and Mexico (22). Ventura, M. U. was the highest producing author with six articles. In the co-authorship networks, two main networks were found: the first with Fregonezi, G. A. F., Hata, F. T. and Ventura, M. U. and the second with Grądzki, Z. The growing interest in Bokashi as a sustainable alternative in agricultural production systems should allow to establish and build networks of scientific publications, scientific journals, researchers, research organization, countries and keywords.

Keywords: fermented manure, effective microorganisms, SCOPUS, VOSviewer.

INTRODUCCIÓN

La producción agrícola es una de las actividades antropogénicas que genera contaminantes ambientales debido al uso intensivo de agroquímico, principalmente fertilizantes y plaguicidas, provocando la degradación del suelo, el agotamiento de la materia orgánica y la fertilidad del suelo. La intensificación de la agricultura acompañada de la urbanización y la industrialización ha acelerado de manera drástica la tasa de generación de residuos orgánicos e inorgánicos (Babla *et al.*, 2022), esto generando una creciente preocupación de las empresas, instituciones e investigadores en buscar sistemas de producción agrícolas sostenibles para impulsar innovaciones globales para reducir, reciclar y reutilizar los

residuos orgánicos, así, fabricar productos de valor agregado, como enmiendas de suelos agrícolas y fuente de nutrición para las plantas (Volkov *et al.*, 2022).

Desde el punto de vista de la sostenibilidad, existen fuertes argumentos a favor del reciclaje de nutrientes dentro de la sociedad, significando un mayor uso de fuentes de nutrientes orgánicos en la agricultura. En la actualidad se cuentan con muchas materias primas diferentes para los abonos orgánicos, como estiércoles de animales, subproductos de mataderos, subproductos vegetales, abonos verdes, algas, compost, digestatos anaeróbicos, etc. Todos estos abonos orgánicos tienen en común que su disponibilidad es limitada, no siempre consisten con respecto al contenido de nutrientes, y que requieren degradación microbiana para mineralizar su contenido de nutrientes, y, por lo tanto, se caracterizan más o menos como abonos de liberación lenta (Bergstrand, 2022).

Una alternativa de producción agrícola sostenible es la agroecología, basada en la aplicación de principios ecológicos al diseño y manejo de producción de alimentos y conservación de recursos a través de formas colectivas de acción social (Galicia Gallardo *et al.*, 2020). La aplicación de materia orgánica en un modelo de agroecología, lo cual engloba una solución integrada a la problemática, como: la reducción de la fertilidad de los suelos, la degradación y contaminación por las malas prácticas agrícolas, caracterizada por el uso indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas, entre otros. Una de las prácticas agroecológicas es el transformar la materia orgánica en abono orgánicos tanto sólidos como líquidos (Quispe, 2015). En términos generales un abono orgánico es el resultado del proceso de descomposición, aeróbica o anaeróbica, de los residuos de plantas y animales, además, de los residuos industriales y municipales (biosólidos), en condiciones adecuadas de humedad, aireación, temperatura, microorganismos, que mineralizan los residuos en humus, por ejemplo algunos abonos orgánicos son: abonos verdes, bioles, biosólidos, abonos fermentados, compost, vermicompost, téis minerales, estiércol animal, lixiviados de compost y vermicompost, nutrihora y por últimos, sin menos importarte el Bokashi (Moreno *et al.*, 2019).

El Bokashi ha sido usado como abono orgánico por los agricultores japoneses, definiéndolo como “materia orgánica fermentada”, se puede elaborar con materiales locales, por lo que presenta variaciones de acuerdo a la materia prima disponible en la región (Ramos y Terry, 2014). El Bokashi, es un método de elaboración de compost orgánica sólida de origen japonés (Sandoval-Cancino *et al.*, 2022), donde ocurre una transformación aeróbica biológica de residuos orgánicos con fuente de energía (como la melaza) que aceleran la oxidación de la materia orgánica a través de una fase termofílica (45 a 65 °C) en la que los microorganismos liberan calor, dióxido de carbono y agua, lo que permiten obtener un producto en un corto periodo de tiempo (Álvarez-Solis *et al.*, 2016).

El abono orgánico Bokashi presenta efectos benéficos sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento de los cultivos debido a su fracción orgánica, los efectos directos de los

microorganismos introducidos y los efectos indirectos de los metabolitos sintetizados por los microorganismos (p. ej., fitohormonas y reguladores del crecimiento) (Yamada y Xu, 2000).

De acuerdo a Pandit *et al.* (2020) quienes evaluaron la aplicación de tres abonos orgánicos (compost tradicional, compost aeróbica y Bokashi) en el cultivo de maíz (*Zea mays*), registraron que el Bokashi mezclado con Biocarbón aumento la biomasa del cultivo en un 234 % en comparación a la fertilización sintética (N-P-K). El Bokashi incrementa la actividad y biomasa microbiana del suelo (Urta *et al.*, 2019), provocando una mayor mineralización de la materia orgánica, incrementando la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Pérez-Godínez *et al.*, 2017). Las plantas de acelga (*Beta vulgaris*) tratadas como EM-Bokashi presentaron un mayor contenido de fósforo y magnesio en comparación al control (Daiss *et al.*, 2008). En México se han realizado investigaciones evaluando el efecto del Bokashi en los cultivos hortícolas: chiles verdes, chiles habaneros, brócoli, cebolla, obteniendo efectos favorables en la productividad, desarrollo y crecimiento de los cultivos (Jaramillo-López *et al.*, 2015; Álvarez-Solis *et al.*, 2016; Peralta-Antonio *et al.*, 2019).

Por otra parte, en la literatura, el término “bibliometría” es descrita como “la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos a la literatura científica (libros y otros medios de comunicación), y desde entonces es una herramienta eficaz para comprender y analizar tendencias de investigaciones en diversas áreas de estudios. Con la bibliometría, se identifican los artículos, autores, revistas, países, y sus conexiones en investigaciones publicadas que abordan un tema en particular (Fialho *et al.*, 2023).

De acuerdo a Ferreira *et al.* 2020, observaron que aún no se ha abordado el conocimiento científico sobre el Bokashi, además, no existía una investigación bibliográfica sobre este fertilizante orgánico. En su estudio estos mismos autores registraron que el 50 % de los artículos publicados sobre Bokashi en el periodo 1999-2019 están enfocados en las áreas de agricultura y ciencias biológicas, ciencias ambientales, mientras que áreas como veterinaria, ciencias sociales, química, energía, ingeniería química, inmunología y microbiología, bioquímica, genética y biológica molecular, son escasas las investigaciones relacionadas con fertilizantes y/o abonos.

Una manera de comprender la implementación de la aplicación de los abonos orgánicos como el Bokashi a nivel mundial en tiempo de sostenibilidad agrícola, es a través de la revisión sistemática de la literatura y de indicadores bibliométricos. Los indicadores bibliométricos son herramientas que ayudan a cuantificar la producción científica y evaluar el impacto en la comunidad. Para el análisis bibliométrico se precisa de información bibliográfica, de forma general, se puede fraccionar en indicadores bibliométricos de revistas y de autores (individuales y de colaboraciones) (Alonso *et al.*, 2009; Corrales-Reyes *et al.*, 2017). Bajo la perspectiva anterior, el objetivo de la investigación fue caracterizar la producción científica mundial sobre el abono Bokashi indexada en la base de datos SCOPUS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de desarrollar un análisis bibliométrico se realizó la búsqueda e identificación de la literatura mundial sobre el abono orgánico Bokashi en la base de datos de la colección SCOPUS propiedad de Elsevier. Este proceso se realizó el 10 de agosto de 2022 mediante el siguiente algoritmo de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (Bocashi) OR TITLE-ABS-KEY (Bokashi)) vinculado a título del artículo, resumen y palabras claves.

Como el término Bokashi o Bocashi se usa frecuentemente para referirse al mismo abono orgánico, los términos no se limitaron durante el proceso de recuperación. La información de los documentos que cumplían con los requisitos: año de publicación, idioma, revista, título, autor, afiliación, palabras clave, tipo de documento, resumen y recuento de citas fueron exportaron en formato CSV a Microsoft Excel y RIS (Research Information Systems) para posteriormente ser analizados por los softwares VOSviewer versión 1.6.18 (van Eck y Waltman, 2010) y Harzing's Publish or Perish 8.0 (Harzing, 2007), respectivamente.

En la búsqueda de la productividad científica se incluyó: artículos científicos, conferencias, capítulos de libros, notas cortas, revisiones y conferencia de revisión. Se consideraron los idiomas: español, inglés y portugués. La productividad científica identificada y recolectada permitió en un primer momento realizar un análisis descriptivo e identificar la productividad científica, tipología de documentos, países, revistas, autores e instituciones que están publicaron más sobre el tema.

En segundo momento con el formato RIS importado en el software Harzing's Publish or Perish 8.0, se analizaron las variables: total de números, total de artículos, citas, promedio de citas por año, promedio de citas por artículos, promedio de citas por autores, promedio de citas por autores por año, promedio de artículos por autor, promedio de autores por artículo, índice h, índice g, índice h contemporáneo (hc), índice h individual (hi), índice hi normalizado, índice AWCR, índice AW, índice e, índice hm, índice hi anual, amplitud H, amplitud G.

Descripción de las mediciones analizadas mediante el procedimiento descrito por Alonso *et al.* (2009) y Corrales-Reyes *et al.* (2017).

El índice h representa la distribución de citas del trabajo de un investigador, una métrica que indica la productividad (número de publicaciones) y el impacto de las citas (número de citas por publicaciones) de los autores (Hirsch, 2005). Consiste en ordenar las publicaciones de un autor de forma decreciente en relación a las citas recibidas por cada publicación. En el momento en el que el rango (posición en la lista) supera o iguala al valor de la cita, ahí se obtiene el índice h. Esto significa que el autor tiene h publicaciones con al menos h citas, o sea, un autor tiene un índice «h» si tiene «h» artículos que han sido citados al menos «h» veces.

El índice g es la raíz cuadrada de la suma de las citas sea el mayor número en orden decreciente de citas.

El índice hc, tiene en cuenta el tiempo del artículo

publicado y sus citas. Para la estimación el índice hi se divide el índice h entre el número de autores promedio con que publica el autor. Para obtener el índice hi normalizado se seleccionan las citas de cada artículo que tributa al índice h y se divide entre el número de autores que tiene el trabajo y se calcula el índice h resultante.

El índice AWCR constituye la proporción de citas en función de la edad del artículo. Mide todas las citas ajustadas por la edad de cada documento que incluye el índice h tradicional. Es un promedio de las citas donde cada documento se divide por el número de años del artículo y se calcula como la raíz cuadrada de todas las citas. El índice AW se define como la raíz cuadrada del índice AWCR para permitir la comparación con el índice h. Se aproxima al índice h si la tasa de cita (promedio) permanece más o menos constante a lo largo de los años.

El índice e es la raíz cuadrada de la suma de las citas de los trabajos incluidos en el índice h. El índice hm divide el artículo entre los autores y tiene en cuenta el número de citas completas y se calcula el índice h resultante. El índice hi anual analiza el impacto anual de la revista.

Por último, con apoyo del software VOSviewer versión 1.6.10 se elaboró una red con las principales coautorías entre autores, coautoría entre países, la co-ocurrencia de todas las palabras claves. Se aplican dos atributos de ponderación estándar que se definen como "Atributo de enlaces" y "Atributo de fuerza de enlace total" (3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La productividad sobre el abono orgánico Bokashi indexada en SCOPUS fue de 161 documentos. Desde enero del año 1999 – 10 agosto del 2022, la producción presentó un incremento exponencial ($R^2 = 0.71$). En la Figura 1 se muestra la tendencia de los 161 documentos publicados, se estimó que la media fue de siete por año. En el periodo que se analizó el número de publicaciones por año sobre Bokashi tuvo un comportamiento ascendente, con la mayor productividad en el año 2021 (27 publicaciones) y la menor productividad fue el 2001 (0 publicaciones). Los artículos y conferencias sobresalieron como la tipología documental más utilizadas con 126 (5.48 artículos por año) y 25 (1.09 conferencias por año), que representan un 80.1 y 15.5 % del total de la productividad, respectivamente (Figura 2). El 87.58 % (141) de publicaciones fueron escritos en inglés, el 6.21 % (10) en portugués, 4.35 % (7) en español, 1.25 % (2) en inglés y portugués y el 0.62 % (1) de las publicaciones en inglés y español.

Países e instituciones más productivas

Los documentos fueron publicados por autores con adscripciones en instituciones provenientes de 44 países y un total de 86 (53.41 %) de las publicaciones fueron de acceso abierto. Brasil se clasificó como el principal país en la cantidad de documentos publicados en relación sobre el Bokashi con 39 publicaciones y el 24.23 % de la producción mundial. Después de Brasil prosiguió Indonesia con 31, México con 22 y Japón con 11 y también destacó Polonia con 11. En general,

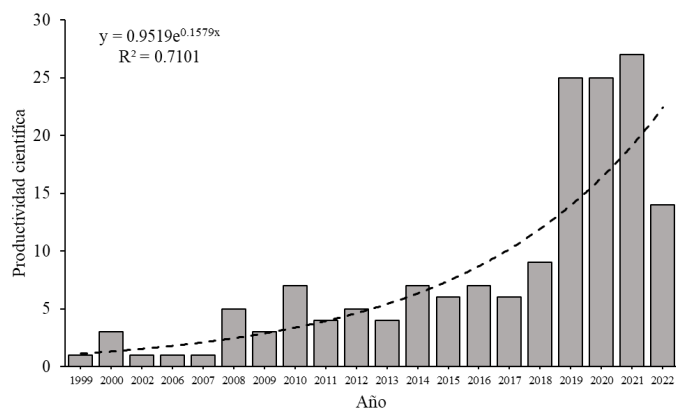


Figura 1. Distribución de la productividad científica con respecto al abono orgánico Bokashi en SCOPUS.

Figure 1. Distribution of scientific productivity with respect to Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

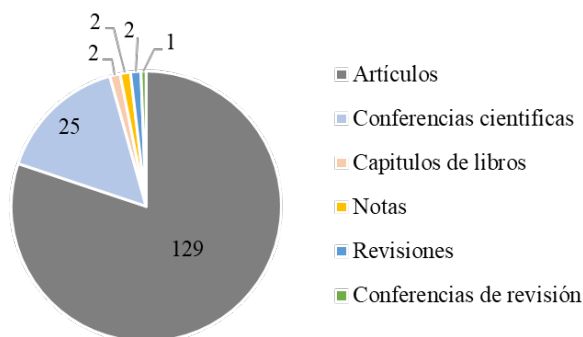


Figura 2. Tipología documental con respecto al abono orgánico Bokashi en SCOPUS.

Figure 2. Documentary typology regarding Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

en estos países las publicaciones sobre Bokashi están en la zona de ciencias ambientales, agropecuarias y ciencias biológicas. Las investigaciones publicadas son en relación al efecto del Bokashi como agente de aporte de nutrientes al medio de crecimiento (suelo o sustrato) y a las plantas (Figura 3).

En México, el número de publicaciones sobre Bokashi fue de 22 artículos, que representa 13.66% del total de las publicaciones. Las investigaciones sobre el Bokashi se enfocan primordialmente en su uso el aporte de nutrientes al suelo y planta, además, la transformación de los estiércoles y residuos de cultivos en abono orgánicos (Figura 3).

Por otra parte, en las primeras 10 instituciones con mayor cantidad de documento sobre Bokashi, se encontró a la Universitas Hale Oleo de Indonesia como la institución con mayor número de publicaciones con un total de 10 (6.3%). Posteriormente, la Universidade Estadual de Londrina de Brasil con ocho publicaciones (5.0%). Alcanzan a entrar en este listado Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa y Universidade Federal de Lavras con seis publicaciones cada una, ambas de Brasil. Es importante destacar que cinco instituciones (35%) de las 14 instituciones más

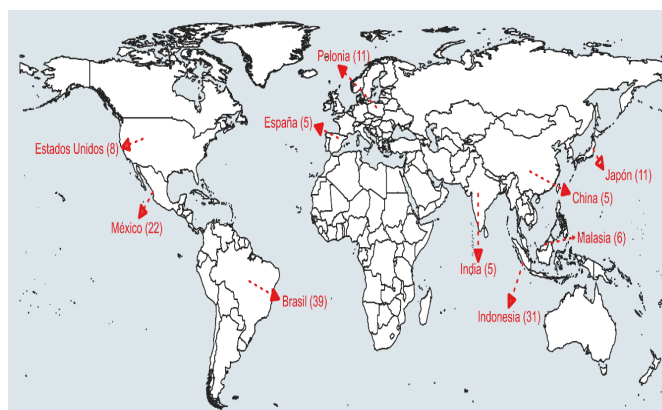


Figura 3. Top ten de países más productivos y número de publicaciones sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS

Figure 3. Top ten most productive countries and number of publications on Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

productivas son ubicadas en Brasil. De las 10 instituciones, International Nature Farming Research Center produjo cinco publicaciones y 136 citas, seguida por Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa con seis publicaciones y 40 citas. Tres instituciones mexicanas, están posicionadas en el décimo lugar con cuatro publicaciones cada una y un total de 88 citas (Tabla 3).

Padrón de autorías

Es posible observar que de los 10 autores que más artículos publicados relacionados a el abono orgánico Bokashi, solo cuatro destacan: Ventura, M. U. (orcid: 0000-0002-3536-2568) con adscripción en la Universidade Estadual de Londrina, Grądzki, Z. (orcid:0000-0002-5390-3225) de University of Life Science in Lublin, Hata, F.T. (orcid:0000-0003-0590-743X) y Fregonezi, G. A. F. de Universidade Estadual de Londrina. Con esto, se puede observar que el número de investigaciones realizadas y de investigadores interesados en el área es aún limitado. El autor Xu, H.L (orcid.org/0000-0002-3031-9085) con cuatro publicaciones del International Nature Farming Research Center, Matsumoto en Japón fue el autor más citado con un total de 112 citas lo que representa un 10.98% del total citas que han recibió las publicaciones sobre Bokashi (Tabla 1). Los autores que se posicionaron dentro del top ten con adscripción en instituciones mexicanas son Jaramillo-López, P. F. [Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) - Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México] y Álvarez- Solís, J.D. (El Colegio de la Frontera Sur-ECOSUR), tal como se observa en la Tabla 1.

Revistas de investigación influyentes

La Tabla 2 muestra las 10 principales fuentes de revistas científicas en las que se han publicado investigaciones sobre el abono orgánico Bokashi a nivel mundial desde 1999 a 2022. De los 161 documentos publicados, dieciocho (11.18 %) fueron publicados en Iop Conference Serie Earth and Environmental Science, cuatro (2.5 %) fueron publicados en Applied Soil Ecology y otros cuatro en la revista Horticultura

Tabla 3. Top ten de instituciones más productivas sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS.**Table 3.** Top ten most productive institutions on Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

Ranking estándar de competitividad	Institución	Número de documentos	Citas	Promedio de citas por documento	País
1st	Universitas Halu Oleo	10	5	0.5	Indonesia
2st	Universidade Estadual de Londrina	8	16	2	Brasil
3st	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa	6	40	6.67	Brasil
4st	Universidade Federal de Lavras	6	39	6.5	Brasil
5st	International Nature Farming Research Center	5	136	27.2	Japón
6st	University of Life Science in Lublin	5	39	7.8	Polonia
7st	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Mina Gerais	5	20	4	Brasil
8st	Wageningen University y Research	4	36	9	Países Bajos
9st	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho	4	9	2.25	Brasil
10st	Instituto de Investigación en Ecosistemas y Sustentabilidad	4	27	6.75	México
10st	Centro de Investigación y Estudios Avanzados	4	34	8.5	México
10st	Universitas Syiah Kuala	4	1	0.25	Indonesia
10st	Universitas Tadulako	4	6	1.5	Indonesia
10st	UNAM Campus Morelia	4	27	6.75	México

Tabla 1. Top ten de los autores con más publicaciones sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS.**Table 1.** Top ten authors with the most publications on Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

Ranking	Autor	Número de documentos publicados	Citas	Promedio de citas por publicaciones
1st	Ventura, M. U.	6	10	1.67
2st	Grądzki, Z.	5	39	7.8
3st	Hata, F.T.	5	8	1.6
3st	Fregonezi, G.A. F.	5	14	2.8
4st	Ansi, A.	4	0	0
5st	Halim	4	0	0
6st	Jaramillo-López, P.F.	4	27	6.75
7st	Karimuna, L.	4	3	0.75
8st	Wijayanto, T.	4	2	0.5
9st	Xu, H.L.	4	112	28
10st	Álvarez-Solís, J.D.	4	37	9.25

Brasileira. Tres revistas del top ten se encuentran en el cuartil 1 de Scopus (Applied Soil Ecology, Animals y Archives of Agronomy and Soil Science). Asimismo, de acuerdo a Scopus, la mayoría de las revistas que han publicado sobre el tema de Bokashi se encuentran clasificadas en el área de Agricultura y Ciencias Biológicas con 108 publicaciones (40.4 %), Ciencias Ambientales con 48 publicaciones (18.1 %), Ciencia de la Tierra y Planetaria con 19 publicaciones (7.2 %), Bioquímica, Genética y Biología Molecular con 18 publicaciones (6.8 %) e Inmunología y Microbiología (5.7 %) con 15 publicaciones. Las revistas mostradas en la Tabla 2 tienen como objetivo difundir la investigación multidisciplinaria de interés en biología, fisiología vegetal y calidad de alimentos de origen vegetal.

Estas 10 revistas produjeron 44 (27.33 %) de un total de 161 publicaciones. Applied Soil Ecology (Cuartil 1) surgió como fuente principal con cuatro publicaciones, 135 citas, seguido de Journal of Crop Production, una revista con 0.385

Tabla 2. Top ten de revistas científicas más productivas sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS.**Table 2.** Top ten most productive scientific journals on Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

Ranking	Revista	TP	TC	CPP	CiteSore	SNIP	SJR	País
1st	Iop Conference Serie Earth and Environmental Science	18	6	0.33	0.6	0.409	0.202 -	Reino Unido
2st	Applied Soil Ecology	4	135	33.75	7.2	1.41	1.107 Q1	Países Bajos
3st	Horticultura Brasileira	4	11	2.75	1.4	0.775	0.37 Q2	Brasil
4st	Animals	3	7	2.33	2.7	1.13	0.61 Q1	Suiza
5st	Emirates Journal of Food and Agriculture	3	5	1.66	1.9	0.597	0.273 Q3	Emiratos Árabes Unidos
6st	Journal Of Crop Production	3	109	36.33	2.8	0.961	0.385 Q2	Estado Unidos
7st	Probiotics And Antimicrobial Proteins	3	29	9.67	7.9	1.35	0.812 Q2	Estados Unidos
8st	Acta Horticulturae	2	3	1.5	0.5	0.226	0.163 Q4	Bélgica
9st	Archives of Agronomy and Soil Science	2	30	15	5.3	1.064	0.654 Q1	Reino Unido
10st	Bioscience Research	2	0	0	0.1	0.500	0.133 -	Pakistán

TP= total de publicaciones, TC= total de citas, CPP = citas por publicaciones, SNIP=impacto normalizado por artículo por revista.

de factor de impacto SJR con tres publicaciones y 109 citas. El 40 % de las revistas pertenecen a Reino Unido (2) y EE. UU. (2), mientras que Países Bajos, Brasil, Suiza, Emiratos Árabes Unidos, Bélgica y Pakistán tenían una revista cada uno (Tabla 2).

Artículos altamente citados

En la Tabla 5 destaca los diez artículos más citados sobre el abono orgánico Bokashi. Es interesante que tres artículos se publicaron en 2019. El 40 % de esos artículos se publicaron en Applied Soil Ecology (2) y Journal of Crop Production (2), estos artículos superan las 40 citas. El artículo "How effective

are 'Effective microorganisms' (EM)? Results from a field study in temperate climate" de Mayer *et al.* (2010) publicado en Applied Soil Ecology obtuvo las citas más altas (80). Los artículos de Boechat *et al.* (2013), Laskowska *et al.* (2017) y Ndonga *et al.* (2011) al final de la lista recibieron 22 citas cada uno. El recuento promedio de citas de los 14 artículos más citados fue de 37.5 (intervalo 80 – 22). La Tabla 6 presenta la lista de los 14 artículos del top ten de documentos más citados ordenado por año de publicación, donde las principales informaciones extraída fue: autor, año, especie estudiada, tipo de fertilizante, foco de estudio, metodología y respuesta.

Tabla 5. Top ten de documentos más citados relacionados sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS.

Table 5. SCOPUS top ten most cited documents related to Bokashi organic fertilizer.

Ranking estándar de competitividad	Autores	Título	Revista	Citas	Tipo de documento
1st	Mayer <i>et al.</i> (2010)	How effective are 'Effective microorganisms' (EM)? Results from a field study in temperate climate	Applied Soil Ecology	80	Artículo
2st	Yamada y Xu (2000)	Properties and applications of an organic fertilizer inoculated with effective microorganisms	Journal of Crop Production	56	Artículo
3st	Aulinas y Bonmatí (2008)	Evaluation of composting as a strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua	Bioresource Technology	54	Artículo
4st	Xu <i>et al.</i> (2000)	Effects of organic fertilizers and a microbial inoculant on leaf photosynthesis and fruit yield and quality of tomato plants	Journal of Crop Production	50	Artículo
5st	Urrea <i>et al.</i> (2019)	The application of fresh and composted horse and chicken manure affects soil quality, microbial composition and antibiotic resistance	Applied Soil Ecology	43	Artículo
6st	Abdul <i>et al.</i> (2019)	Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income	Renewable Energy	42	Artículo
7st	Pérez-Godínez <i>et al.</i> (2017)	Growth and reproductive potential of <i>Eisenia foetida</i> (Sav) on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting	Waste Management	29	Artículo
7st	Daiss <i>et al.</i> (2008)	The effect of three organic pre-harvest treatments on Swiss chard (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cykla</i> L.) quality	European Food Research and Technology	29	Artículo
8st	Pandit <i>et al.</i> (2020)	Nutrient effect of various composting methods with and without biochar on soil fertility and maize growth	Archives of Agronomy and Soil Science	26	Artículo
8st	Formowitz <i>et al.</i> (2007)	The role of "effective microorganisms" in the composting of banana (<i>Musa ssp.</i>) residues	Journal of Plant Nutrition and Soil Science	26	Artículo
9st	Pei-Sheng y Hui-Lian (2002)	Influence of EM Bokashi on nodulation, physiological characters and yield of peanut in nature farming fields	Journal of Sustainable Agriculture	24	Artículo
10st	Boechat <i>et al.</i> (2013)	Net mineralization nitrogen and soil chemical changes with application of organic wastes with 'Fermented Bokashi Compost'	Acta Scientiarum - Agronomy	22	Artículo
10st	Ndonga <i>et al.</i> (2011)	Effective micro-organisms' (EM): An effective plant strengthening agent for tomatoes in protected cultivation	Biological Agriculture and Horticulture	22	Artículo
10st	Laskowska <i>et al.</i> (2019)	Effect of Multi-Microbial Probiotic Formulation Bokashi on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in the Serum, Colostrum and Milk of Sows, and in a Culture of Polymorphonuclear Cells Isolated from Colostrum	Probiotics and Antimicrobial Proteins	22	Artículo

Tabla 6. Artículos más citados sobre Bokashi relacionados con las áreas de agricultura y las ciencias biológicas.
Table 6. Most cited articles on Bokashi related to the areas of agriculture and biological sciences.

Referencia	Especie estudiada	Tipo de fertilizantes	Foco de estudio	Objetivo de investigación	Respuesta
Pandit <i>et al.</i> (2020)	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Tres métodos de compostaje diferentes para investigar las técnicas de transformación de nutrientes orgánicos; i) convencional compostaje (proceso de compostaje completado sin voltear las pilas) ii) compostaje aeróbico (proceso de compostaje con volteo manual de pilas) y iii) compostaje Bokashi (lacto-fermentación anaeróbica)	Suelo	Mejorar los nutrientes disponibles en el suelo (principalmente P y K) y aumentar la biomasa del maíz.	Compostaje Bokashi – Biochar aumento la biomasa en un 243% y mejor disponibilidad de nutrientes en el suelo (P disponible y otros cationes básicos intercambiables (K ⁺ , Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺).
Laskowska <i>et al.</i> (2019)	Cerdas	Microorganismos eficientes (EM) y Bokashi	Animal	Determinar el efecto de la formulación de Bokashi sobre las concentraciones de citoquinas pro y antiinflamatorias en el suero de cerdas durante la gestación, en su calostro y leche, y en un cultivo de células polimorfonucleares estimuladas con Con-A.	El Bokashi mejoró la digestibilidad total aparente del nitrógeno y la energía en el tracto. Una mejor utilización de los nutrientes durante el embarazo y la lactancia afecta directamente la calidad del calostro y la leche.
Urra <i>et al.</i> (2019)	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Estiércol seco de caballo y aves y Bokashi fresco compostado	Suelo	Cambios inducidos por la enmienda en las propiedades microbianas del suelo y la abundancia y riesgo de diseminación de genes de resistencia a antibióticos (ARG) a través de la transferencia horizontal de genes (HGT).	Los suelos enmendados con estiércol fresco mostraron valores más altos de actividad y biomasa microbiana.
Abdul <i>et al.</i> (2019)	-	Estiércol de cabra, estiércol de pollo, desechos de pescado, desechos de arroz, efluentes de molinos de aceite de palma y lodos de aguas residuales y Bokashi	Sustrato	Se comparó la producción de biogás a partir de estos sustratos usando inóculo industrial y Bokashi tradicional como catalizadores.	Los desechos agrícolas con inóculo industrial produjeron las concentraciones más altas de biogás, mientras que el Bokashi tradicional fue ineficaz para producir gas metano.
Pérez-Godínez <i>et al.</i> (2017)	-	Compost de estiércol de animales de zoológico y caballo, Bokashi y vermicompost	<i>Eisenia foetida</i>	Se evaluó la permanencia y el potencial reproductivo de <i>Eisenia foetida</i> , así como la calidad del vermicompost resultante de (a) compostaje tradicional y (b) precompostaje bokashi durante 1 mes, seguido de vermicompostaje durante 3 meses.	El vermicompostaje después del precompostaje con Bokashi produjo los valores más altos de % de pérdida de MO, % de pérdida de N, y la relación capacidad intercambio catiónico/carbono orgánico, en comparación con los obtenidos por vermicompostaje después del precompostaje utilizando el método de compostaje tradicional. Estos tres parámetros indicaron una mayor mineralización y, por lo tanto, una mayor diversidad microbiana y nutrientes fácilmente disponibles para las plantas.
Boechat <i>et al.</i> (2013)	-	Residuos orgánicos y Bokashi	Suelo	Evaluar la eficacia de los residuos orgánicos y <i>Fermentados Bokashi Compost</i> (FBC), para establecer el uso más eficiente de los residuos orgánicos para un suelo, cambiando la red de mineralización de nitrógeno y propiedades químicas del suelo.	Degradación más acelerada de los abonos orgánicos, resultando en una cantidad más rápida de nutrientes disponibles para las plantas.

Referencia	Especie estudiada	Tipo de fertilizantes	Foco de estudio	Objetivo de investigación	Respuesta
Ndonga <i>et al.</i> (2011)	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Microorganismos eficientes (EM), suspensión de polvo de piedra y Bokashi	Sustrato	Determinar el efecto del tratamiento de plantas de tomate cultivadas orgánicamente con microorganismos efectivos (EM) combinado con una suspensión de polvo de piedra (tratamiento EM).	Los contenidos de N inorgánico del sustrato fueron más bajos en el control en primer año de estudio, pero aumentaron cuando se agregó Bokashi de salvado de trigo en el siguiente año.
Mayer <i>et al.</i> (2010)	-	Microorganismos eficientes (EM) y Bokashi y estiércol de ganado	Sustrato	Evaluar las preparaciones de EM (i) el agente de pulverización EMA, (ii) EMA con el sustrato orgánico enriquecido con EM Bokashi y (iii) EMA con Bokashi y estiércol de corral.	Los efectos de sustrato observados de EM Bokashi en la estructura de la comunidad en el suelo monitoreado por RISA fueron compensados por la población indígena del suelo en menos de 1 año.
Daiss <i>et al.</i> (2008)	Acelga (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cycla</i> L)	Microorganismos eficientes (EM), EM-Bokashi y Greengold*	Planta	Evaluar el efecto de diferentes tratamientos orgánicos (EM, Bokashi y Greengold*) precosecha sobre la calidad física, química y nutricional de la acelga.	Las plantas del tratamiento control tenían un mayor contenido de agua que las plantas tratadas con EM, EM-Bokashi + EM y Greengold*. Las acelgas tratadas con EM-Bokashi presentaron menor contenido de ácido ascórbico y mayor contenido de fósforo y magnesio que las plantas del control.
Formowitz <i>et al.</i> (2007)	Banana (<i>Musa</i> sp.)	Microorganismos efectivos y Bokashi	Planta y sustrato	Investigar los efectos de la adición de EM en la descomposición de residuos de banano durante la producción de Bokashi. Se compararon los tratamientos no EM con EM Bokashi: Bokashi producido con agua, con melaza como aditivo EM y con EM esterilizado.	Los resultados proporcionan evidencia de que el efecto promotor del crecimiento de las plantas de EM Bokashi agregado se basó en el sustrato orgánico aplicado en lugar de la adición de EM.
Aulinas y Bonmatí (2008)	-	Compost, Bokashi y vermicompost	Biogás	Identificar y cuantificar los flujos de residuos del mercado municipal Alfredo Lazo del municipio de Estelí; caracterizar la composición de los residuos sólidos producidos, y evaluar cuatro técnicas de compostaje de la fracción orgánica, a saber, compostaje en hileras, compostaje en hileras con residuos de jardín, Bokashi y vermicompost.	La mayor parte de los residuos producidos son orgánicos (90.9% de los residuos) con un contenido en nitrógeno del 2.8%.
Pei-Sheng y Hui-Lian (2002)	Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	Fertilizante sintético y Bokashi	Planta	Se investigaron las propiedades fisiológicas y el rendimiento de las plantas de maní en un campo de agricultura natural. En comparación con el fertilizante químico, el fertilizante EM Bokashi aumentó significativamente tanto el número de nódulos por planta como el peso fresco por nódulo.	El crecimiento vegetativo y reproductivo de la planta de maní en el tratamiento EM Bokashi se promovió significativamente. Los pesos secos de brotes y raíces en el tratamiento EM Bokashi fueron significativamente más altos que en el tratamiento químico. El número total de vainas y el peso seco de las vainas en el tratamiento con fertilizante EM Bokashi fueron significativamente más altos que en el tratamiento con fertilizante químico.

Referencia	Especie estudiada	Tipo de fertilizantes	Foco de estudio	Objetivo de investigación	Respuesta
Xu <i>et al.</i> (2001)	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Estiércol de ave y Bokashi y microorganismos eficientes (EM)	Planta	Examinar los efectos de las aplicaciones de un fertilizante orgánico (Bokashi) y estiércol de pollo, así como la inoculación de un inoculante microbiano (nombre comercial, EM) a Bokashi y estiércol de pollo sobre la fotosíntesis y el rendimiento y la calidad de la fruta de las plantas de tomate.	La inoculación de EM tanto en Bokashi como en estiércol de pollo aumentó la fotosíntesis y el rendimiento de frutos de las plantas de tomate. Las concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos fueron mayores en frutos de plantas fertilizadas con Bokashi que en frutos de otros tratamientos. La concentración de vitamina C fue mayor en la fruta de las parcelas de estiércol de pollo y Bokashi que en las parcelas de fertilizantes químico
Yamada y Xu (2000)	-	Microorganismos eficientes (EM) y Bokashi	Suelo- planta	Se realizaron estudios de investigación para dilucidar las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de un fertilizante orgánico (Bokashi) que fue inoculado y fermentado con un inoculante microbiano EM.	Los efectos beneficiosos del Bokashi sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento de los cultivos probablemente dependerán de la fracción orgánica, los efectos directos de los microorganismos introducidos y los efectos indirectos de los metabolitos sintetizados por microbios (p. ej., fitohormonas y reguladores del crecimiento).

Indicadores bibliométricos

La productividad científica sobre el abono orgánico Bokashi ha recibido un total de 1020 citas, con un promedio de 44.35, 6.34 y 290.52 citas por año, artículos y autores, respectivamente. Las publicaciones poseen un índice h de 16 (es decir, 16 artículos han sido citados al menos 16 veces) y un índice g de 6 (Tabla 4). El artículo de Mayer *et al.* (2010) fue el más citado, denominado "How effective are 'Effective microorganisms (EM)' Results from a field study in temperate climate", teniendo 80 citas, publicado con doi:10.1016/j.apsoil.2010.08.007 en la revista Applied Ecology con ISSN: 0929-1393. El objetivo del artículo con mayor número de citas fue evaluar los efectos de las preparaciones de microorganismos efectivos y Bokashi, suministrados cuatro años consecutivos, sobre el rendimiento de los cultivos, (ii) sobre los parámetros microbianos que caracterizan la biomasa, la estructura y la actividad de la comunidad microbiana del suelo, y (iii) en la descomposición de sustratos orgánicos.

Red de las co-autorías

En cuanto a las redes de coautorías con al menos cinco publicaciones, se encontraron dos redes principales: la primera con Fregonezi, G. A. F., Hata, F. T. y Ventura, M. U. (fuerza total de enlace 9) y, la segunda, con Grądzki, Z. (fuerza total de enlace 0) (Figura 4). Se registro en total 159 autores que han participado en las publicaciones de los documentos del abono organico Bokashi. Entre ellos Ventura, M. U. de la Universidade Estadual de Londrina teniendo un total de seis artículos que se centran principalmente en la protección vegetal, la fertilización orgánica, el rendimiento y calidad de hortaliza, además, en microbiología del suelo (Shingo y Ventura, 2009; Hata *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2020; Hata *et al.*,

Tabla 4. Indicadores cientométricos de la productividad científica sobre el abono orgánico Bokashi en SCOPUS.

Table 4. Scientometric indicators of scientific productivity on Bokashi organic fertilizer in SCOPUS.

Indicadores	Cifras
Citas	1020
Años	23
Citas/año	44.35
Citas/artículos	6.34
Citas/autores	290.52
Citas/autores/año	12.63
Artículos/autor	45.13
Autores/artículo	4.63
Índice h	16
Índice g	6
Índice hc	14
Índice hl	4.14
Índice hl normalizado	7
AWRC	194.52
Índice AW	13.95
Índice e	17.64
Índice hm	8.94
Índice hl anual	0.3
Cobertura H	55.6
Cobertura G	69.5

2021a; Hata *et al.*, 2021b; Sousa *et al.*, 2021). Los principales colaboradores con el mencionado autor son: Hata, F. T. y Fregonezi, G. A. F., los cuales ha participado en la publicación de cinco artículos generado una fuerza de enlace de nueve. El trabajo más reciente fue generado en donde participa Ventura, M, U., con los colaboradores Hata, F. T. y Fregonezi, G. A. F. es titulado "Bokashi, boiled manure and penergetic applications increased agronomic production variable and

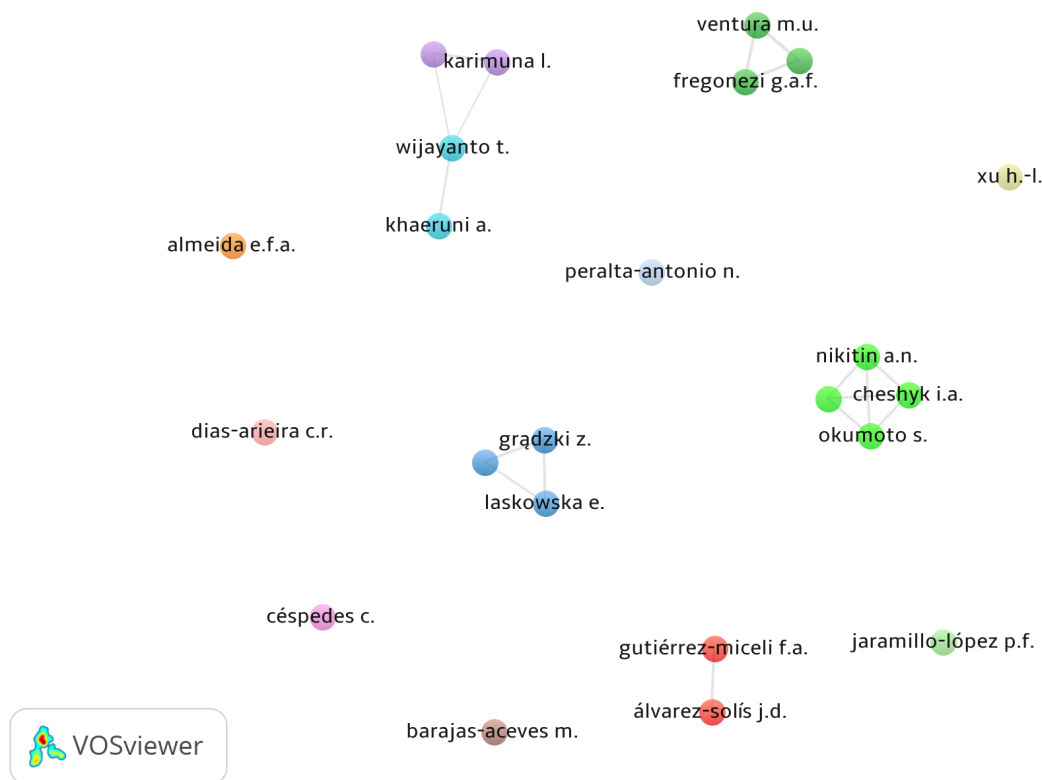


Figura 4. Red de coautoría entre autores por documento sobre el abono orgánico Bokashi.
Figure 4. Co-authorship network between authors per document on Bokashi organic fertilizer.

may enhance powdery mildew severity of organic tomato plants”, el objetivo del estudio fue evaluar fuentes orgánicas de fertilización (estiércol hervido, Bokashi y Penergetic) por sus efectos sobre variables agronómicas (tamaño de fruto, rendimiento de planta, sólidos solubles totales) y sobre oídio (*Leveillula taurica* LéV. G. Arnaud) severidad en plantas de tomate, publicado en la revista Horticulturae ISSN: 2311-7524 con un CiteScore 2021 de 1.8, 0.468 SJR 2021 Y 1.124 SNIP 2021.

Análisis de las palabras claves de los autores

Las palabras claves proporcionadas por los autores de las publicaciones fueron 1290, de las cuales 48 alcanzaron el umbral. Las palabras que se registraron con mayor frecuencia fueron Bokashi (fuerza total de enlace 130), microorganismos eficientes (fuerza total de enlace 77) y fertilizantes (fuerza total de enlace 79). En la Figura 5 se muestran las principales palabras claves relacionadas a las publicaciones sobre el abono orgánico Bokashi. Se puede apreciar cuatro *clusters* representados por cuatro colores distintos que agrupan las diversas relaciones de los conceptos y en los cuales se pueden visualizar las redes de citación. El clúster rojo los principales conceptos utilizados son: Bokashi, compost, fertilizantes orgánicos, y fermentación. Estos conceptos hacen referencia a la propuesta de la utilización del Bokashi como una alternativa sustentable para la producción agrícola-

la. Por su parte, en el clúster verde los principales conceptos claves utilizados son: fertilizantes, microorganismos efectivos y agricultura y suelo. Estos conceptos hacen referencia a la utilización del Bokashi como una enmienda para los suelos, además de ser una fuente de nutrición para las plantas (Figura 5).

El tamaño de los nodos, sumado a lo central y periférico de estos, permiten apreciar los nexos de un concepto con otro. Con la ayuda de estas herramientas gráficas es posible identificar los vacíos de conocimiento o los temas donde se necesita más investigación. En los bordes de la red de co-ocurrencia entre todas las palabras claves. Se pueden observar las palabras clave más segregadas y por tanto menos desarrolladas. En esta red de co-ocurrencia de todas las palabras clave en publicaciones sobre el Bokashi, está claro que los asuntos de sustentabilidad dentro del tema del Bokashi no se han abordado de manera concreta; por ejemplo: microorganismos, materiales orgánicos, actividad microbiana, desechos alimentarios y animales son áreas en las que se deben concentrar los esfuerzos de investigación (Figura 5).

Las palabras claves proporcionadas por los autores con relación al abono orgánico Bokashi (y que aparecieron más de cinco veces en la base de datos central VOSviewer), se incluyeron en el análisis final. De las 478 palabras claves en las publicaciones, siete alcanzaron el umbral, generando una fuerza total de 15. Las palabras claves que aparecen

CONCLUSIONES

El uso del abono orgánico Bokashi es una alternativa ecológica como enmienda de los suelos agrícolas y como fuente de nutrición para las plantas. El Bokashi es una opción para ser utilizado con enfoque sostenible en la agricultura y ha recibido la atención de los investigadores involucrados en la producción de alimentos agrícolas a nivel mundial. Pueden llevar al Bokashi a niveles más altos y adoptarlo para resolver problemas en múltiples áreas de la producción agrícola como son: enfermedades del suelo y/o planta, infertilidad de los suelos, contaminación por los estiércoles y residuos de cultivos o cosecha agrícolas. Sin embargo, aún faltan informes bibliométricos que muestren la explotación de un patrón de investigación en profundidad sobre el Bokashi. En este trabajo se ha realizado un análisis bibliométrico en el cual se involucraron 161 documentos que se publicaron entre 1999 y 2022 en la base de datos SCOPUS. Este análisis bibliométrico descubre que los investigadores sobre Bokashi estaban más interesados en publicar en artículos científicos que en conferencias, libros o capítulos de libros. Aparte de esto, el principal autor que más publicó es Ventura, M. U. con seis artículos, seguido de Ventura, M. U., Hata, F.T. Y Fregonezi, G.A. F. con cinco artículos. Este documento también descubre que los investigadores sobre Bokashi estaban adoptando este abono para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los sustratos y suelos agrícolas, y para reducir la contaminación por los estiércoles y residuos orgánicos. La aplicación de Bokashi mejora el rendimiento de las plantas, incrementa el porcentaje de germinación, la calidad sensorial y nutricional de los frutos. Sin duda, el crecimiento y desarrollo de las plantas están relacionados con las propiedades del medio de crecimiento las cuales son favorecidas por el suministro del Bokashi. Por lo tanto, debido al interés que ha generado el Bokashi como opción en la producción agrícola se pueden establecer y generar redes de publicaciones científicas en revistas de difusión y/o divulgaciones de tópicos agropecuarios, así aprovechar el potencial del Bokashi que podrían expandirse a investigadores, organización de investigaciones y países interesados en garantizar la seguridad alimentaria.

REFERENCIAS

- Abdul, A. N. I. H., Hanafiah, M. M., y Mohamed Ali, M. Y. 2019. Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income. *Renewable Energy*, 132, 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.149>
- Alonso, S., Cabrerizo, F. J., Herrera-Viedma, E., y Herrera, F. 2009. h-Index: A review focused in its variants, computation and standardization for different scientific fields. *Journal of Informetrics*, 3(4), 273-289. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2009.04.001>
- Álvarez-Solís, J. D., Mendoza-Núñez, J. A., León-Martínez, N. S., Castellanos-Albores, J., y Gutiérrez-Miceli, F. A. 2016. Effect of Bokashi and vermicompost leachate on yield and quality of pepper (*Capsicum annum*) and onion (*Allium cepa*) under monoculture and intercropping cultures.

- Ciencia e Investigacion Agraria, 43(2), 243-252. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202016000200007>
- Aulinas, M. M., y Bonmatí, B. A. 2008. Evaluation of composting as a strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua. *Bioresource Technology*, 99(11), 5120-5124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.083>
- Babla, M., Katwal, U., Yong, M.-T., Jahandari, S., Rahme, M., Chen, Z.-H., y Tao, Z. 2022. Value-added products as soil conditioners for sustainable agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106079>
- Bergstrand, K.-J. 2022. Organic fertilizers in greenhouse production systems – a review. *Scientia Horticulturae*, 295. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110855>
- Boechat, C. L., Santos, J. A. G., y Accioly, A. M. A. 2013. Net mineralization nitrogen and soil chemical changes with application of organic wastes with 'Fermented Bokashi Compost'. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 35(2), 257-264. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i2.15133>
- Corrales-Reyes, I. E., Fornaris-Cedeño, Y., y Reyes-Pérez, J. J. 2017. Análisis bibliométrico de la revista investigación en educación médica . Período 2012-2016. *Investigación en Educación Médica*. <https://doi.org/10.1016/j.riem.2017.02.003>
- Daiss, N., Lobo, M. G., Socorro, A. R., Brückner, U., Heller, J., y Gonzalez, M. 2008. The effect of three organic pre-harvest treatments on Swiss chard (*Beta vulgaris* L. var. *cycla* L.) quality. *European Food Research and Technology*, 226(3), 345-353. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0543-2>
- Fialho, M. H. M., Furtado, J. M. R., Leandro, D. V. E., y Nogueira, M. R. 2023. A bibliometric and scientometric analysis on the use of UAVs in agriculture, livestock and forestry. *Ciencia Rural*, 53(8), 1-12. doi.org/10.1590/0103-8478cr20220130
- Ferreira, D. P. V. N., Alves, M. M. E., Assuncao, C. O. J., Choiti, T. J. L., y Hilsdorf, P. R. 2020. A bibliographic review on bokashi from the last 20 years. *Research society and development*, 10(9), 1-44. doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8339
- Formowitz, B., Elango, F., Okumoto, S., Müller, T., y Buerkert, A. 2007. The role of "effective microorganisms" in the composting of banana (*Musa* ssp.) residues. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(5), 649-656. <https://doi.org/10.1002/jpln.200700002>
- Galicia Gallardo, A. P., Cecon, E., Castillo, A., y González-Esquivel, C. E. 2020. Resisting socio-ecological vulnerability: agroecology and indigenous cooperativism in La Montaña, Guerrero, Mexico. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 45(1), 65-85. <https://doi.org/10.1080/21683565.2020.1793871>
- Harzing, A. W. 2007. *Publish or Perish*. <https://harzing.com/resources/publish-or-perish>
- Hata, F. T., de Paula, M. T., Moreira, A. A., Ventura, M. U., de Lima, R. F., Fregonezi, G. A. F., y de Oliveira, A. L. M. 2021a. Organic fertilizations and fertigation with chicken boiled manure for organic crop. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 38(2), 342-359. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v38.n2.07](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v38.n2.07)
- Hata, F. T., Spagnuolo, F. A., de Paula, M. T., Moreira, A. A., Ventura, M. U., Fregonezi, G. A. D. F., y de Oliveira, A. L. M. 2020. Bokashi compost and biofertilizer increase lettuce agronomic variables in protected cultivation and indicates substrate microbiological changes. *Emirates Journal of Food*

- and Agriculture, 32(9), 640-646. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i9.2142>
- Hata, F. T., Ventura, M. U., Fregonezi, G. A. F., y de Lima, R. F. 2021b. Bokashi, boiled manure and penergetic applications increased agronomic production variables and may enhance powdery mildew severity of organic tomato plants. *Horticulturae*, 7(2), 1-8, Article 27. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020027>
- Hata, F. T., Ventura, M. U., Sousa, S., y Fregonezi, G. A. F. 2019. Low-cost organic fertilizations and bioactivator for arugula-radish intercropping. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(10), 773-778. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i10.2018>
- Hirsch, J. E. 2005. An index to quantify an individual's scientific research output. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16569-16572.
- Jaramillo-López, P. F., Ramírez, M. I., y Pérez-Salicrup, D. R. 2015. Impacts of Bokashi on survival and growth rates of *Pinus pseudostrobus* in community reforestation projects. *Journal of Environmental Management*, 150, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.003>
- Laskowska, E., Jarosz, Ł., y Grądzki, Z. 2017. The effect of feed supplementation with effective microorganisms (EM) on pro- and anti-inflammatory cytokine concentrations in pigs. *Research in Veterinary Science*, 115, 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.008>
- Laskowska, E., Jarosz, Ł., y Grądzki, Z. 2019. Effect of Multi-Microbial Probiotic Formulation Bokashi on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in the Serum, Colostrum and Milk of Sows, and in a Culture of Polymorphonuclear Cells Isolated from Colostrum. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 220-232. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9380-9>
- Mayer, J., Scheid, S., Widmer, F., Fließbach, A., y Oberholzer, H. R. 2010. How effective are 'Effective microorganisms® (EM)? Results from a field study in temperate climate. *Applied Soil Ecology*, 46(2), 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.007>
- Moreno, R. A., Briceño, C. E. A., Valenzuela, N. L. M., y Hernández, H. J. A. 2019. Abonos orgánicos: una alternativa sustentable en la agricultura. In R. A. Moreno y C. J. L. Reyes (Eds.), *Temas selectos de sustentabilidad, un reto permanente para el nuevo milenio*.
- Ndona, R. K., Friedel, J. K., Spornberger, A., Rinnofner, T., y Jezik, K. 2011. Effective micro-organisms' (EM): An effective plant strengthening agent for tomatoes in protected cultivation. *Biological Agriculture and Horticulture*, 27(2), 189-203. <https://doi.org/10.1080/01448765.2011.9756647>
- Pandit, N. R., Schmidt, H. P., Mulder, J., Hale, S. E., Husson, O., y Cornelissen, G. 2020. Nutrient effect of various composting methods with and without biochar on soil fertility and maize growth. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(2), 250-265. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1610168>
- Pei-Sheng, Y., y Hui-Lian, X. 2002. Influence of EM bokashi on nodulation, physiological characters and yield of peanut in nature farming fields. *Journal of Sustainable Agriculture*, 19(4), 105-112. https://doi.org/10.1300/J064v19n04_10
- Peralta-Antonio, N., de Freitas, G. B., Watthier, M., y Santos, R. H. S. 2019. Compost, bokashi and efficient microorganisms: Their benefits in successive crops of broccoli. *Idesia*, 37(2), 59-66. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000200059>
- Pérez-Godínez, E. A., Lagunes-Zarate, J., Corona-Hernández, J., y Barajas-Aceves, M. 2017. Growth and reproductive potential of *Eisenia foetida* (Sav) on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting. *Waste Management*, 64, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.036>
- Quspe, L. A. 2015. El valor potencial de los residuos sólidos orgánicos, rurales y urbanos para la sostenibilidad de la agricultura *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(1), 83-95.
- Ramos, A. D., y Terry, A. E. 2014. Generalidades de los abonos orgánicos: importancia del bocashi como alternativa nutricional para suelo y planta. *Cultivos Tropicales*, 35(4), 52-59.
- Sandoval-Cancino, G., Zelaya-Molina, L. X., Ruíz-Ramírez, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Aragón-Magadán, M. A., Rojas-Anaya, E., y Chávez-Díaz, I. F. 2022. Agricultural genetic resources as a source of resilience in the face of the covid-19 pandemic in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 25(1), 1-26.
- Shingo, G. Y., y Ventura, M. U. 2009. Collard greens yield with mineral and organic fertilization. *Semina: Ciencias Agrarias*, 30(3), 589-594. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2009v30n3p589>
- Sousa, V., Ventura, M. U., Hoshino, A. T., Hata, F. T., y Constantino, L. V. 2021. Development and population growth of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) on strawberry fertilized with different doses and sources of organic fertilizers. *International Journal of Acarology*, 47(6), 528-535. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.1965655>
- Urra, J., Alkorta, I., Lanzén, A., Mijangos, I., y Garbisu, C. 2019. The application of fresh and composted horse and chicken manure affects soil quality, microbial composition and antibiotic resistance. *Applied Soil Ecology*, 135, 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.11.005>
- van Eck, N. J., y Waltman, L. 2010. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2), 523-538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Volkov, A., Morkunas, M., Balezentis, T., y Streimikiene, D. 2022. Are agricultural sustainability and resilience complementary notions? Evidence from the North European agriculture. *Land Use Policy*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2021.105791>
- Xu, H. L., Wang, R., y Mridha, M. A. U. 2001. Effects of organic fertilizers and a microbial inoculant on leaf photosynthesis and fruit yield and quality of tomato plants. *Journal of Crop Production*, 3(1), 173-182. https://doi.org/10.1300/J144v03n01_15
- Yamada, K., y Xu, H. L. 2000. Properties and applications of an organic fertilizer inoculated with effective microorganisms. *Journal of Crop Production*, 3(1), 255-268. https://doi.org/10.1300/J144v03n01_21



Caracterización morfo – cultural y variabilidad genética y molecular de aislamientos de *Trichoderma*

Morpho-cultural characterization and genetic and molecular variability of *Trichoderma* isolates

Danay Ynfante-Martínez¹, Benedicto Martínez-Coca¹, Belkis Peteira-Delgado^{1*}, Yusimy Reyes-Duque², Katia Gil³, June Simpson³, Alfredo Herrera-Estrella³

¹ Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa. Autopista Nacional km 23½, AP 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

² Dpto. Biología y Sanidad Vegetal, Universidad Agraria de La Habana «Fructuoso Rodríguez Pérez» (UNAH). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Langebio, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Cinvestav, Instituto Politécnico Nacional, IPN. CP 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

El género *Trichoderma*, descrito por Persoon y Rifai, con base en características morfo - fisiológicas, contaba con nueve especies; aunque no se diferenciaban satisfactoriamente. Las técnicas moleculares permitieron ratificar e identificar otras nuevas; actualmente, se notifican 453 especies de *Trichoderma*. La identificación polifásica se impone, debido a las complejidades del género. El trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislados de *Trichoderma* tomando como base aspectos morfo-culturales y genéticos. Las descripciones morfológicas se realizaron por observaciones microscópicas de microcultivos, según Rifai, Gams y Bissett. La compatibilidad vegetativa se evaluó macroscópicamente, y se determinó el tipo de reacción (compatible o incompatible). La variabilidad genética se analizó por RAPD; utilizando el método Jaccard mediante el paquete estadístico FreeTree. Los aislados presentaron características morfológicas similares, aunque hubo diferencias en la coloración de las colonias y la morfometría de las estructuras fúngicas. Fueron compatibles con las especies *T. viride*, *T. asperellum* y *T. atroviride*, y entre ellos. Los RAPD generaron 92 bandas reproducibles, 65 fueron polimórficas (70,7 %). El agrupamiento por UPGMA mostró variabilidad intraespecífica, formándose cuatro grupos. Para *T.13*, *T.17*, *T.75* y *T.78* se detectaron bandas específicas, útiles para el diseño de cebadores específicos para la autenticación, protección y monitoreo en sistemas productivos.

Palabras clave: caracterización morfométrica, compatibilidad vegetativa, variabilidad genética.

ABSTRACT

The genus *Trichoderma*, described by Persoon and Rifai, on the basis of morpho-physiological characteristics, had nine species; however, they were not satisfactorily differentiated. The molecular techniques allowed to ratify and to identify other new ones; at present, 453 *Trichoderma* species are reported. The polyphasic identification is imposed, due to the complexities of the genus. The objective of this work was to characterize *Trichoderma* isolates based on morphological-cultural and genetic aspects. Morphological descriptions

were made from microscopic observations of microcultures, according to Rifai, Gams and Bissett. The vegetative compatibility relationships were macroscopically evaluated, and the type of reaction (compatible or incompatible) was determined. The genetic variability was analyzed by RAPD; using the Jaccard method with the FreeTree statistical package. The isolates presented similar morphological characteristics, although there were differences in the colonies coloration and the fungal structures morphometry. They were compatible with *T. viride*, *T. asperellum* and *T. atroviride* species, and each other. RAPD generated 92 reproducible bands, 65 were polymorphic (70.7 %). Clustering by UPGMA showed intraspecific variability, forming four groups. For *T.13*, *T.17*, *T.75* and *T.78* specific bands were detected, useful for the specific primers design for authentication, protection and monitoring in productive systems.

Keywords: morphometric characterization, vegetative compatibility, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad intra e interespecífica en el género *Trichoderma* dificulta la identificación de las especies. Aún en la actualidad, esto provoca discrepancias entre autores, respecto a diferentes taxas de los clados clasificados (Druzhinina y Kubicek, 2005 6B; Martínez *et al.*, 2015).

En las primeras caracterizaciones morfológicas y culturales de aislamientos del género *Trichoderma* se detectó polimorfismo. Este fue uno de los motivos para que se designaran nueve especies agregadas (Rifai, 1969). La variabilidad entre aislamientos de una misma especie se observó, además, en aspectos, fisiológicos y bioquímicos (Gakegne, 2018) y moleculares (Pandya *et al.*, 2017). Esta, en algunos casos, motivó que ciertos aislados se identificaran como especies diferentes. En relación con esto, Lieckfeldt *et al.* (1999) demostraron que la especie *Trichoderma viride* Pers. ex S. F. Gray estaba constituida por dos tipos morfológicamente distintos (tipo I y II) y distinguieron al tipo I como el “verdadero” *T. viride* (el anamorfo de *Hypocrea*) y el tipo II como una nueva especie, identificada molecularmente y nombrada como *Trichoderma*

asperellum Samuels Lieckfeldt & Nirenberg (Samuels *et al.* 1999) y en 2010 la de *Trichoderma asperelloides* Samuels sp. nov. como nuevas especies. Además, con la utilización de estas técnicas se reubicaron cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai en especies como *T. asperellum*, *Trichoderma atroviride* Bissett y *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000), y cepas de *T. atroviride* o *T. viride* como *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005). Consecuentemente, el taxa en *Trichoderma* incrementó de nueve, a más de 100 (Druzhinina *et al.*, 2006); 254 (Bissett *et al.*, 2015) y actualmente, se notifican 453 especies (Index Fungorum, 2021).

La incompatibilidad o compatibilidad somática o vegetativa evidencia la existencia o no de variabilidad genética entre aislados de una misma especie de hongo, ya que cepas con cercanía genética entre ellas, muestran patrones similares de compatibilidad y viceversa (Galdames, 2001).

La compatibilidad entre aislados de *Trichoderma* se trató de demostrar sobre la base que las células vegetativas posiblemente basado en la cantidad de núcleos que poseen estas (Samuels *et al.*, 1998), pueden formar heterocarión entre varias especies por medio de la anastomosis hifal, fusión de protoplastos o las transferencias nucleares (Barcellos *et al.*, 2011). Precisamente por esto, la compatibilidad vegetativa permite evaluar las relaciones genéticas entre especies y/o cepas, y es un marcador útil para mostrar diversidad o variabilidad genética en diferentes especies de hongos (Ortuño *et al.*, 2013; Moo koh *et al.*, 2018).

En la actualidad, los marcadores moleculares son ampliamente utilizados para el estudio de relaciones taxonómicas y diversidad genética en disímiles organismos, incluyendo los hongos (El_Komy *et al.*, 2015). Los RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA, Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) son de gran utilidad en la detección de polimorfismo intra e interespecífico en hongos, debido a que la técnica produce perfiles específicos individuales de ADN molde, mediante la amplificación de fragmentos aleatorios que se distribuyen por todo el genoma (Khattak *et al.*, 2018). Esto ha permitido su utilización en el mapeo, como la generación de huellas genéticas (Hassan *et al.*, 2019).

En la Micoteca del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) se conservan aislados con elevadas potencialidades como Agentes de Control Biológico, sin embargo, entre los más promisorios se demostró la existencia de variabilidad patogénica (Cruz-Triana *et al.*, 2018; Gakegne, 2018; Infante y Martínez, 2020; Duarte *et al.*, 2021), que se destacan por su acción biorreguladora sobre una amplia gama de enfermedades en diversos cultivos de interés económico y fisiológica (Infante *et al.*, 2015). Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislados de *Trichoderma* tomando como base aspectos morfo-culturales, su compatibilidad vegetativa y variabilidad molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de muestras y aislamiento de *Trichoderma*

Para el análisis, las muestras vegetales, primeramente se lava-

ron cuidadosamente con abundante agua corriente; durante una hora y secaron con papel de filtro Whatman No. 4. Seguidamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 s y posteriormente con alcohol al 70 % durante 1 min; entre cada desinfección y al final las muestras se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril por tres minutos cada uno y secaron en papel adsorbente estéril. A continuación, las muestras se cortaron en fragmentos de 1 cm y se mezclaron para homogenizar. Por último, se seleccionaron segmentos al azar y sembraron en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio Papa Dextrosa Agar (PDA + antibiótico; cloranfenicol 0,1g L⁻¹) e incubaron a 28 ± 2°C a oscuridad. También, se realizó el montaje de los fragmentos en cámara húmeda; la incubación se realizó a temperatura ambiente.

Las evaluaciones se realizaron diarias hasta la aparición de estructuras reproductivas, durante 24 - 48 h.

Para la identificación, se realizaron preparaciones tomando fracciones de las estructuras fúngicas visibles (micelio y/o esporas); las cuales se visualizaron al microscopio óptico Zeiss (modelo Axiostar plus; fabricado en Alemania) con aumento de 400x. Después se realizaron varias siembras de la colonia obtenida como *Trichoderma*; hasta obtener un cultivo puro.

Los aislamientos y cepas de *Trichoderma* objeto de estudio tienen diferentes orígenes (Tabla 1).

Caracterización morfo - cultural de aislamientos de *Trichoderma*

La caracterización micromorfológica de los aislamientos de *Trichoderma* (*T.*) (*T.*13, *T.*17, *T.*75, *T.*78 y *T.*90) se realizó tomando como base los aspectos morfológicos señalados en las claves taxonómicas referidas por Rifai (1969) y Gams y Bissett (1998): dimensiones y forma de los conidióforos, fiáli-

Tabla 1. Procedencia de los aislamientos y cepas de *Trichoderma*.

Table 1. Geographic origin of *Trichoderma* isolates and strains.

Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	Origen geográfico
<i>T.</i> 13	Cuba ¹ . Guantánamo
<i>T.</i> 17	Cuba ¹ . Pinar del Río
<i>T.</i> 75	Cuba ¹ . La Habana
<i>T.</i> 78	Cuba ¹ . Mayabeque
<i>T.</i> 90	Cuba ¹ . Cienfuegos
<i>T. atroviride</i> (IMI206040)	Suecia ²
<i>T. asperellum</i> (215D)	Holanda ²
<i>T. harzianum</i> (G108)	Guatemala ²
<i>T. viride</i>	Holanda ²

¹Aislamientos cubanos de *Trichoderma*, conservados en el Laboratorio de Micología Vegetal (LMV) del CENSA.

²Cepas de referencia conservadas en el cepario del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), México.

¹Cuban *Trichoderma* isolates, preserved in the Vegetable Mycology Laboratory (VML) of CENSA.

²Reference strains conserved in the strain collection of the National Laboratory of Genomics for Biodiversity (Langebio), Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav) from the National Polytechnic Institute (IPN), Mexico.

des y conidios, y además la ornamentación de estos últimos; mientras que para la caracterización cultural (macroscópica) se tuvo en cuenta el color, forma y textura de las colonias.

Las colonias de *Trichoderma* se obtuvieron a partir de suspensiones de esporas (10 μ L de una suspensión con una concentración de 10^7 conidios.mL⁻¹), procedentes de cultivos puros y monospóricos de tres días de sembrados en el medio de cultivo Agar Malta (AM) (BioCen). La suspensión se depositó centralmente en placas Petri de 90 mm de diámetro, que contenían medio AM (BioCen, pH 5,5), incubadas a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y régimen de oscuridad constante. Las evaluaciones [características de las colonias: color, forma y textura] comenzaron a partir de las 24 h de la inoculación, hasta las 72 h; se determinaron por observación visual, documentadas mediante fotografías tomadas con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

La caracterización micromorfológica de los aislamientos se realizó mediante observaciones microscópicas de las estructuras fúngicas desarrolladas en los microcultivos. Para ello, sobre portaobjetos estériles se vertió asépticamente una película fina de medio de cultivo PDA (BioCen; esterilizado a 121°C , durante 15 min y pH ajustado a 5,5) sobre la cual se sembró un fragmento pequeño de micelio de los aislamientos individualmente, proveniente de la zona de crecimiento activo en la periferia de las colonias, crecidas sobre PDA durante tres días, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y régimen de oscuridad constante. Posteriormente, los portaobjetos sembrados se colocaron en placas Petri de 22 mm de diámetro esterilizadas y se incubaron a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y régimen de oscuridad constante. A las 24 - 48 h de la siembra se visualizaron y midieron las estructuras fúngicas (30 conidióforos, 30 fiáldes y 30 conidios), en un microscopio óptico marca Zeiss (modelo Axiostar plus; fabricado en Alemania) con aumento de 100x y 400x. Las estructuras, se documentaron como evidencia gráfica con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

Variabilidad genética de aislamientos de *Trichoderma* Compatibilidad vegetativa (Cv)

Para realizar el ensayo, se utilizaron cultivos de los aislados de *Trichoderma* del LMV del CENSA, y de las cepas de *T. atroviride* (IMI206040), *T. viride* (TV1), *T. asperellum* (215D) y *T. harzianum* (G108), conservadas en el Laboratorio de Genómica para la biodiversidad, Langebio (Guanajuato, México). Todos los aislados y cepas crecieron durante cinco días en medio PDA (Difco) e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y régimen de oscuridad constante.

Para estimar las relaciones genéticas, se realizaron confrontaciones entre los aislamientos cubanos y entre estos y las cepas de referencia de *Trichoderma*; (Tabla 1). Para ello, un disco de micelio de seis mm de diámetro de cada aislado y cepa de *Trichoderma*, se sembró frente a otro, a una distancia de 70 mm centralmente, en placas Petri de 90 mm de diámetro contentivas de medio PDA (Difco). Posteriormente, las placas se incubaron bajo oscuridad constante a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y

evaluaron a las 72 h. Las evaluaciones de las interacciones se realizaron macroscópicamente y la compatibilidad de los aislamientos se determinó, según el tipo de reacción entre ellos:

- 1) Incompatible: Formación de una línea sin crecimiento evidente en la zona de contacto entre las colonias, normalmente coloreada o pigmentada; o cuando un aislado sobrecrece al otro.
- 2) Compatible: no se observa formación de línea en la zona de interacción después del contacto entre las colonias, aparentando una sola colonia.

Se tomó evidencia gráfica de las interacciones, con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

Variabilidad molecular de aislamientos de *Trichoderma* Método de extracción del ADN

Sobre celofán colocado en el centro de placas Petri ($\varnothing = 90$ mm), contentivas de medio de cultivo PDA (Difco), se sembró centralmente un disco de cada aislamiento cubano (Tabla 1) por placa. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad constante. Posteriormente, el micelio se colectó con una espátula al retirar el celofán de la placa y se congeló a -20°C . Para la extracción del ADN total se usó el protocolo DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, MBH, Germany). El *pellet* se resuspendió en 40 - 60 μ L solución amortiguadora TE 0,5X, incluido en el juego de reactivos. La calidad del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %, con solución amortiguadora de corrida TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 57,1 mL y EDTA 2 mM a pH 8), durante 45 min a 100V, teñido con bromuro de etidio (cinco mg.mL⁻¹) y visualizado en un fotodocumentador (Biorad Gel Doc XR). La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro (nanodrop ND 1000), a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, tomándose como muestras con buena calidad aquellas cuyos valores estuvieron entre 1,8 a 2 (Sambrook *et al.*, 1989). La suspensión de ADN se conservó a 4°C hasta su uso en la técnica para detectar polimorfismo entre los aislados.

Análisis RAPD

En el ensayo se usaron los aislados cubanos de *Trichoderma* (Tabla 1). Para la amplificación por PCR con cebadores arbitrarios, se utilizó una mezcla de reacción cuyo volumen final de 25 μ L contenía: solución amortiguadora de PCR (Tris HCl 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, Taq ADN polimerasa 1U (Invitrogen), 100 ng de ADN genómico total y 0,2 μ M de cada cebador: OPA02, OPA13, OPB07, OPB09, OPB10, OPE14, OPG02, OPG10, OPH03, OPH19 y OPJ20 (Firma Operon Technologies, Alameda).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador API Thermal Cycler; Applied Biosystems, E.U. con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante cinco min, seguido de 45 ciclos de: 94°C durante un min (desnaturalización), 30°C durante 40 s (alineamiento) y 72°C durante dos min (extensión); con un ciclo de extensión final a 72°C , durante 10 min.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en TAE 1X, a 100 V durante

1,5 h. La visualización y el registro de los datos se realizaron como se describió anteriormente.

Análisis de los datos

A partir de los datos se confeccionó una matriz binaria donde se le dio el valor 1 a la presencia de la banda y 0 a la ausencia, solo se tuvieron en cuenta las bandas bien definidas. Posteriormente, se calculó el índice de similitud de Jaccard, se realizó un análisis de conglomerados por el método de UPGMA y un remuestreo tipo “bootstrap” de 10000, para estimar la robustez del dendrograma original, utilizando el paquete de software FreeTree (Hampel *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfo - cultural de aislamientos de *Trichoderma*

Los aislamientos de *Trichoderma* mostraron las siguientes características generales: rápido crecimiento, circular uniforme, colonias inicialmente blanquecinas, que se tornan de color verde o azulado a las 72 h; presencia de hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos en penachos compactados en forma piramidal, fiálides alargadas y ensanchadas en el centro, y conidios ovalados de paredes ligeramente rugosas observadas con aumento de 1000X.

Estas características ubican los aislamientos fundamentalmente en la especie: *T. viride*, según aspectos descritos en las claves propuestas por Rifai (1969) y Gams y Bissett (1998).

Las características morfológicas observadas en los aislamientos coinciden con notificaciones realizadas por Samuels *et al.* (1999) y El-Sobky *et al.* (2019) en cuanto a: presencia de micelio hifal septado e hialino, conidióforo hialino, conidios generalmente ovalados, unicelulares, pequeños, formando racimos terminales, hialinos, de color verde al llegar a la maduración. Así como con las notificadas por Lieckfeldt *et al.* (1999), en cuanto a la ornamentación de los conidios.

No obstante, los aislamientos entre sí, presentaron diferencias en la coloración de las colonias y la morfometría de las estructuras; evidenciándose variabilidad (Tabla 2, Figura 1A y B).

Si solo se tuviera en cuenta la variabilidad observada en los caracteres morfológicos y culturales (Tabla 2), los aislamientos se ubicarían en distintas especies, según lo descrito en la clave de Gams y Bissett (1998). Precisamente esto es uno de los motivos de identificaciones erróneas de especies (Druzhinina *et al.*, 2006), depositadas en las bases de datos (Druzhinina y Kubicek, 2005 6B; Samuels *et al.*, 2010).

Por esta razón, es necesario usar una taxonomía polifásica que aborde varios criterios de clasificación, que permitan identificar con mayor precisión y confiabilidad las especies del género (Samuels *et al.*, 1999; Lieckfeldt *et al.*, 1999; El-Sobky *et al.*, 2019; Haouhach *et al.*, 2020).

La variabilidad se observó, además, al nivel fisiológico, donde algunos de estos aislados pudieron esporular a 35°C, *T.13* y *T.90* procedentes de la región oriental y central del país, donde la mayor parte del año las temperaturas medias son elevadas (Infante *et al.*, 2015). También presentaron diferencias en la excreción de enzimas hidrolíticas, *T.75* tuvo los mayores niveles de actividad quitinasa, mientras que *T.13* y *T.17* los mayores de glucanasa (González *et al.*, 2012). Es posible que la variabilidad detectada intraespecífica esté relacionada con su proceso evolutivo, aspecto a seguir investigando.

Variabilidad genética de los aislamientos de *Trichoderma* Compatibilidad vegetativa (Cv)

Entre las cepas de referencia (Tabla 1), tomadas como patrones, se observaron reacciones de compatibilidad entre cepas de la misma especie (Figura 2 A-E) e incompatibilidad entre especies diferentes (Figura 3 A-C), excepto para la interacción F, G y H (Figura 2), las cuales fueron compatibles, aun siendo especies diferentes.

Tabla 2. Características culturales y morfológicas de los aislamientos de *Trichoderma*, observadas a las 72 h.
Table 2. Morphological and cultural characteristics of *Trichoderma* isolates, observed at 72 h.

Aislamientos	Parámetros			
	Culturales (Fig. 1A)	Morfológicas (Fig.1B)		
	Colonia	Conidióforos (µm)	Fiálides (µm)	Conidios (µm)
T. 13	Verde brillante más oscuro después de las 72h. Presenta anillos que se unifican al pasar el tiempo.	(69) 71,4-88,1 (89,5) × (1,9) 2,3-4,6.	(4,7) 7,5-13,5 (15,9) × 2,3-3,7 (l/a 3,4).	Redondeados y/o elipsoidales 4,8-5,6 (6,4) × 3,2-4 (4,48) (l/a 1,4).
T. 17	Color verde azulado, con crecimiento uniforme, que llega a verde claro olivo durante la maduración de las esporas.	(40,1) 41-88,6 × 1,9-4,7 (5,1).	(5,6) 6,1-8,4 (9,8) × 2,3-3,3 (l/a 2,6).	Redondeados y/o elipsoidales 4,8-5,9 (6,4) × 3,2-4,8 (5,6) (l/a 1,3).
T. 75	Verde olivo oscuro, hasta la maduración de sus esporas. Presenta micelio aéreo blanquecino.	(50,4) 101,2-140 (198,7) × (2,8) 3,3-5,6 (6,5).	5,1-10,3 (12,1) × 2,8-3,7 (l/a 2,5).	Redondeados y/o elipsoidales 4-5 (5,1) × 3,2-4,2 (l/a 1,24).
T. 78	Micelio aéreo de coloración verde olivo amarillento.	(38,2) 40,1-79,3 × (1,9) 2,8-5,1.	(6,5) 8,9-9,3 (10,3) × (2,3) 2,8-4,7 (l/a 2,4).	Redondeados y/o elipsoidales 3,2-4,8 × 2,4-3,8 (4) (l/a 1,4).
T. 90	Verde claro, micelio aéreo abundante.	(38,7) 46,6-93,3 × 3,7-4,7 (5,6) µm (l/a 1,5).	(3,7) 4,7-6,1 × (1,9) 2,3-3,3 µm (l/a 2,3).	Redondeados y/o elipsoidales 4-6,4 × (3,2) 3,5-4,5 (5,6) µm (l/a 1,2).

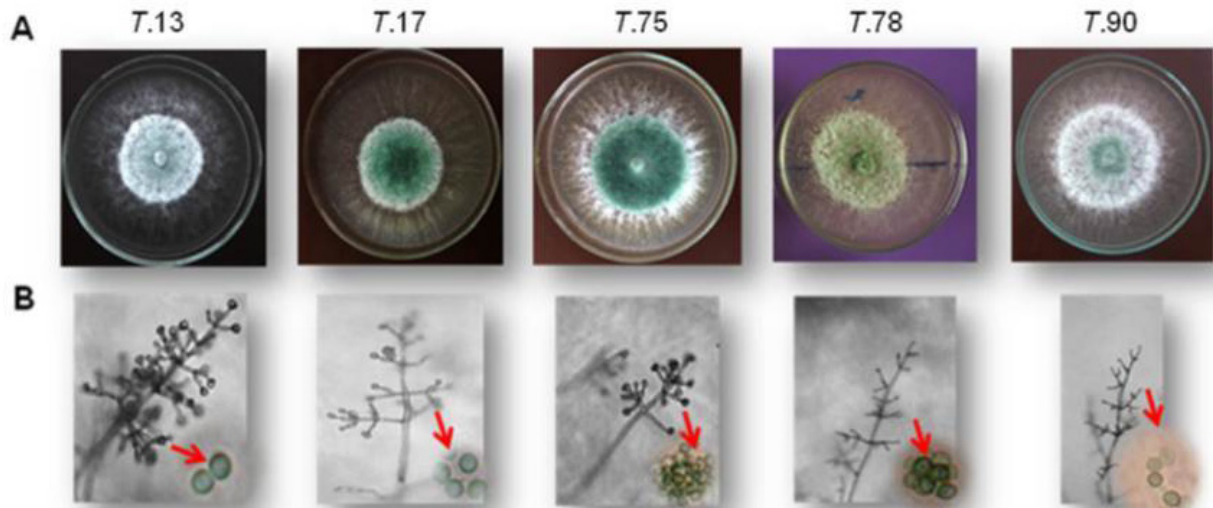


Figura 1. Caracteres morfo-culturales de los aislados de *Trichoderma* sp. A) Características culturales en medio AM (temperatura de 20°C y pH 5,5 a las 72 h). B) Características morfológicas (48 h).

Figure 1. Morpho-cultural characteristics of *Trichoderma* isolates. A) Cultural characteristics in MA culture medium (temperature of 20°C and pH 5.5, at 72 h). B) Morphological characteristics (48 h).

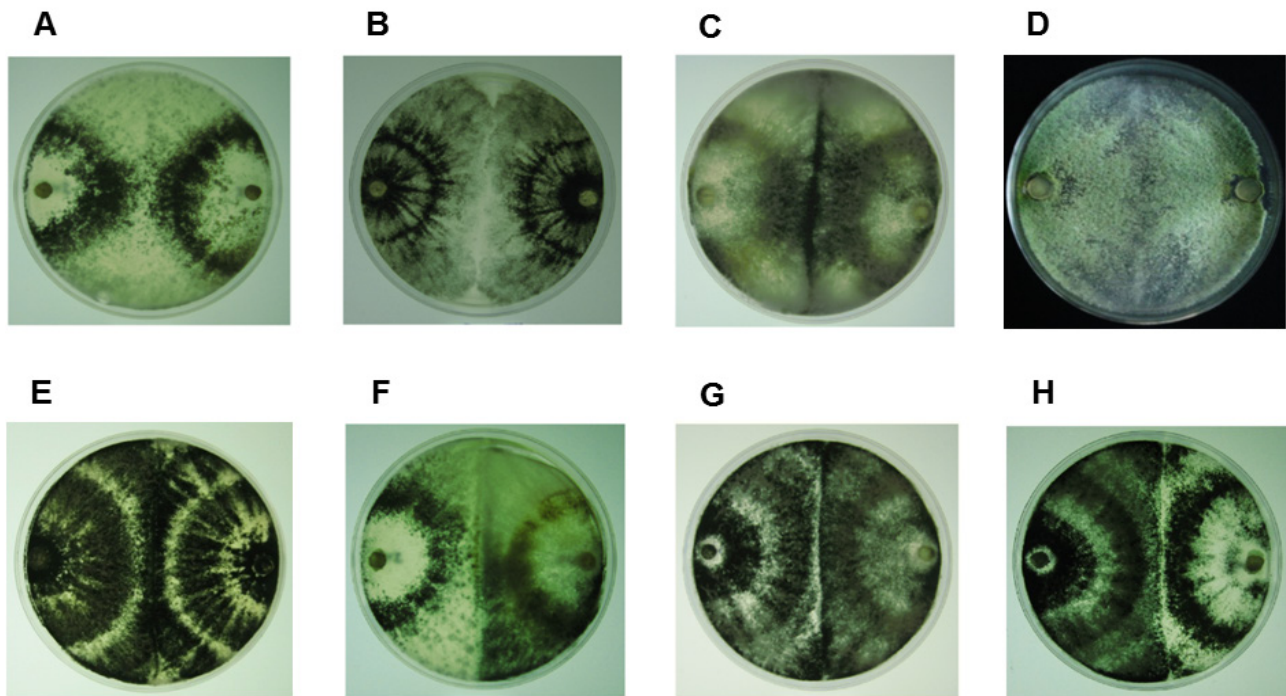


Figura 2. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre las cepas de referencia. A) *T. atroviride* IMI206040 - *T. atroviride* IMI206040, B) *T. virens* - *T. virens*, C) *T. asperellum* 215D - *T. asperellum* 215D, D) *T. harzianum* 204 - *T. harzianum* 204, E) *T. viride* - *T. viride*, F) *T. atroviride* IMI206040 - *T. asperellum* 215D, G) *T. asperellum* 215D - *T. viride*, H) *T. atroviride* IMI206040 - *T. viride*. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 2. Vegetative compatibility reactions between reference strains. A) *T. atroviride* IMI206040 - *T. atroviride* IMI206040, B) *T. virens* - *T. virens*, C) *T. asperellum* 215D - *T. asperellum* 215D, D) *T. harzianum* 204 - *T. harzianum* 204, E) *T. viride* - *T. viride*, F) *T. atroviride* IMI206040 - *T. asperellum* 215D, G) *T. asperellum* 215D - *T. viride*, H) *T. atroviride* IMI206040 - *T. viride*. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

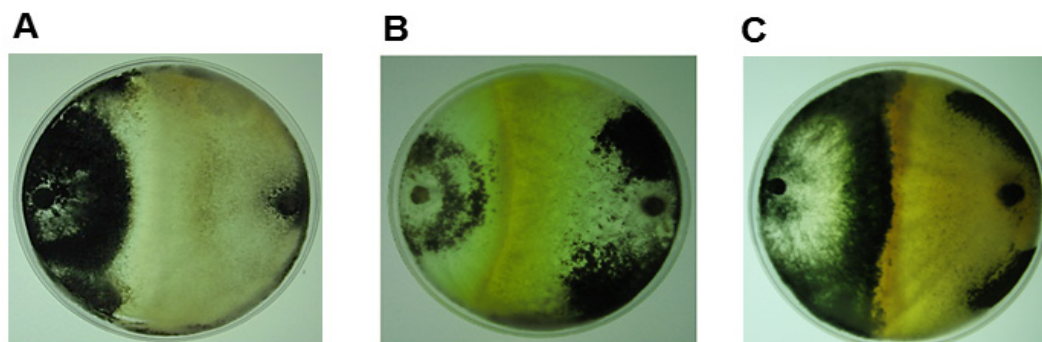


Figura 3. Reacciones de incompatibilidad entre las cepas de referencia. A) *T. asperellum* 215D - *T. harzianum* G108, B) *T. atroviride* IMI206040 - *T. harzianum* G108, C) *T. viride* - *T. harzianum* G108. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].
Figure 3. Incompatibility reactions between the reference strains. A) *T. asperellum* 215D - *T. harzianum* G108, B) *T. atroviride* IMI206040 - *T. harzianum* G108, C) *T. viride* - *T. harzianum* G108. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

Esto indica, que estas especies deben estar genéticamente estrechamente relacionadas, pues la compatibilidad se logra cuando los alelos de todos los loci son idénticos (Galdames, 2001). Este aspecto se tomó como criterio en las observaciones del ensayo para los enfrentamientos de las cepas de referencia con los aislados cubanos.

En las pruebas de confrontación realizadas entre los cinco aislados de *Trichoderma* en estudio y las cepas de referencia antes mencionadas, se observaron también reacciones de compatibilidad e incompatibilidad.

Las confrontaciones entre los aislados en estudio y las cepas de referencia *T. harzianum* (G108), mostraron una clara reacción de incompatibilidad (Figura 4 A-E), determinada por la presencia de una barrera de inhibición [cambio de coloración en las colonias (excreción de metabolitos al medio, Figura 4 A) o inhibición del crecimiento de una de las colonias, Figura 4 E].

Barcellos *et al.* (2011) notificaron que la reacción de incompatibilidad se rige por un loci *het*, que limita la formación de heterocariones entre individuos genéticamente distintos. Es decir, si la diferencia es en uno o más loci *het*, las células que participan en la fusión son compartimentadas y se someten a un proceso lítico que conduce a la muerte celular. En estos casos los aislados son incompatibles; el fenómeno se identifica por la vacuolación, disolución de núcleos y generación de pigmentos, lo que se describió como barrera de reacción (Galdames, 2001).

Por otra parte, en las interacciones de las cepas de *T. asperellum* (215D), *T. atroviride* (IMI206040) y *T. viride* (TV1) con los aislados en estudio se observaron reacciones de compatibilidad (Fig. 5 A-Ñ), al igual que entre los propios aislados (Figura 6 A, B y C).

La compatibilidad observada entre estas especies pudiera estar relacionada con la existencia de un complejo entre *T. viride* - *T. atroviride* (ambas pertenecen a la sección *Trichoderma*, según análisis por ITS) (Lübeck *et al.*, 2000). Consecuentemente, la identificación de *T. asperellum* por técnicas moleculares a partir de *T. viride*, justificó que *T. atroviride* y *T. asperellum* poseen características fenotípicas y talla del fragmento ITS muy similares (Hermosa *et al.*, 2000). Este aspecto explica la compatibilidad existente entre los aislados de estas especies. Es por ello que, algunos aislados de *T. atroviride* o *T. viride* se reclasificaron como *T. asperellum* (Sánchez-García *et al.*, 2017).

En relación con esto, Stocco (2014) demostró que entre las especies de la sección *Trichoderma*, que incluye a *T. viride*, más de una especie puede compartir la misma secuencia de SSU (gen de la pequeña subunidad 18S), lo que indica pocas diferencias entre estas. No se conoce si esta región está correlacionada con la Cv, y que, a ello, se deban los resultados obtenidos. Independientemente, la evaluación de la Cv tiene importancia para la identificación de aislamientos (Galdames, 2001).

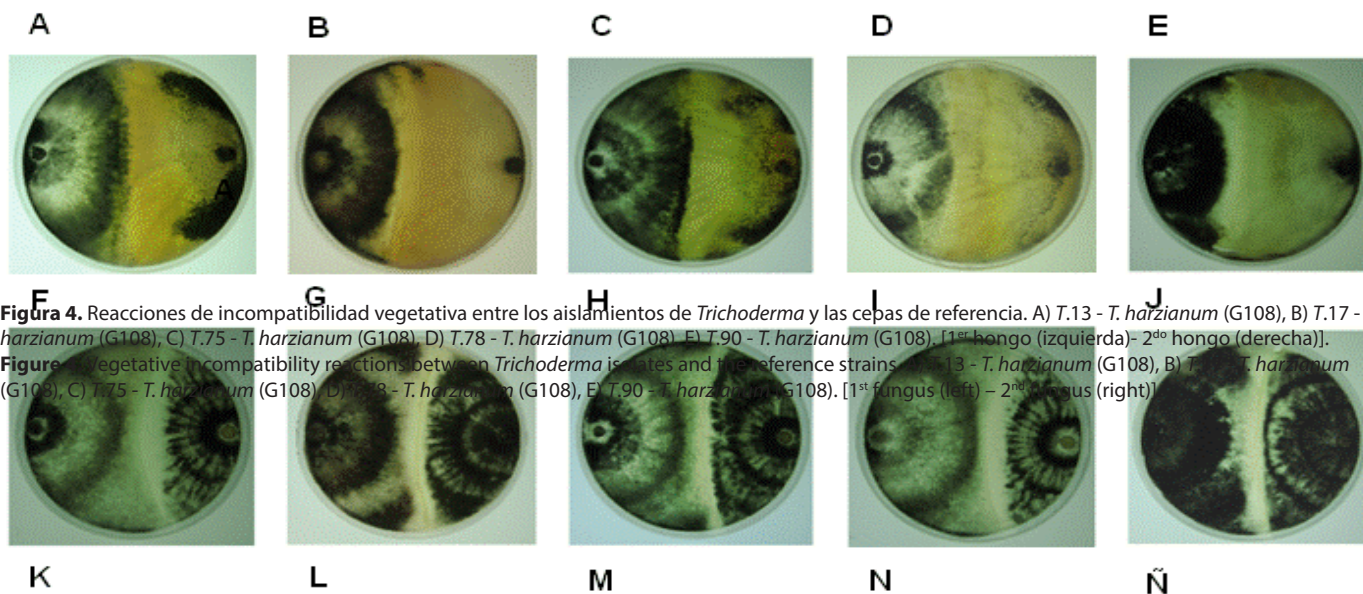


Figura 4. Reacciones de incompatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma* y las cepas de referencia. A) *T.13* - *T. harzianum* (G108), B) *T.17* - *T. harzianum* (G108), C) *T.75* - *T. harzianum* (G108), D) *T.78* - *T. harzianum* (G108), E) *T.90* - *T. harzianum* (G108). [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].
Figure 4. Vegetative incompatibility reactions between *Trichoderma* isolates and the reference strains. A) *T.13* - *T. harzianum* (G108), B) *T.17* - *T. harzianum* (G108), C) *T.75* - *T. harzianum* (G108), D) *T.78* - *T. harzianum* (G108), E) *T.90* - *T. harzianum* (G108). [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

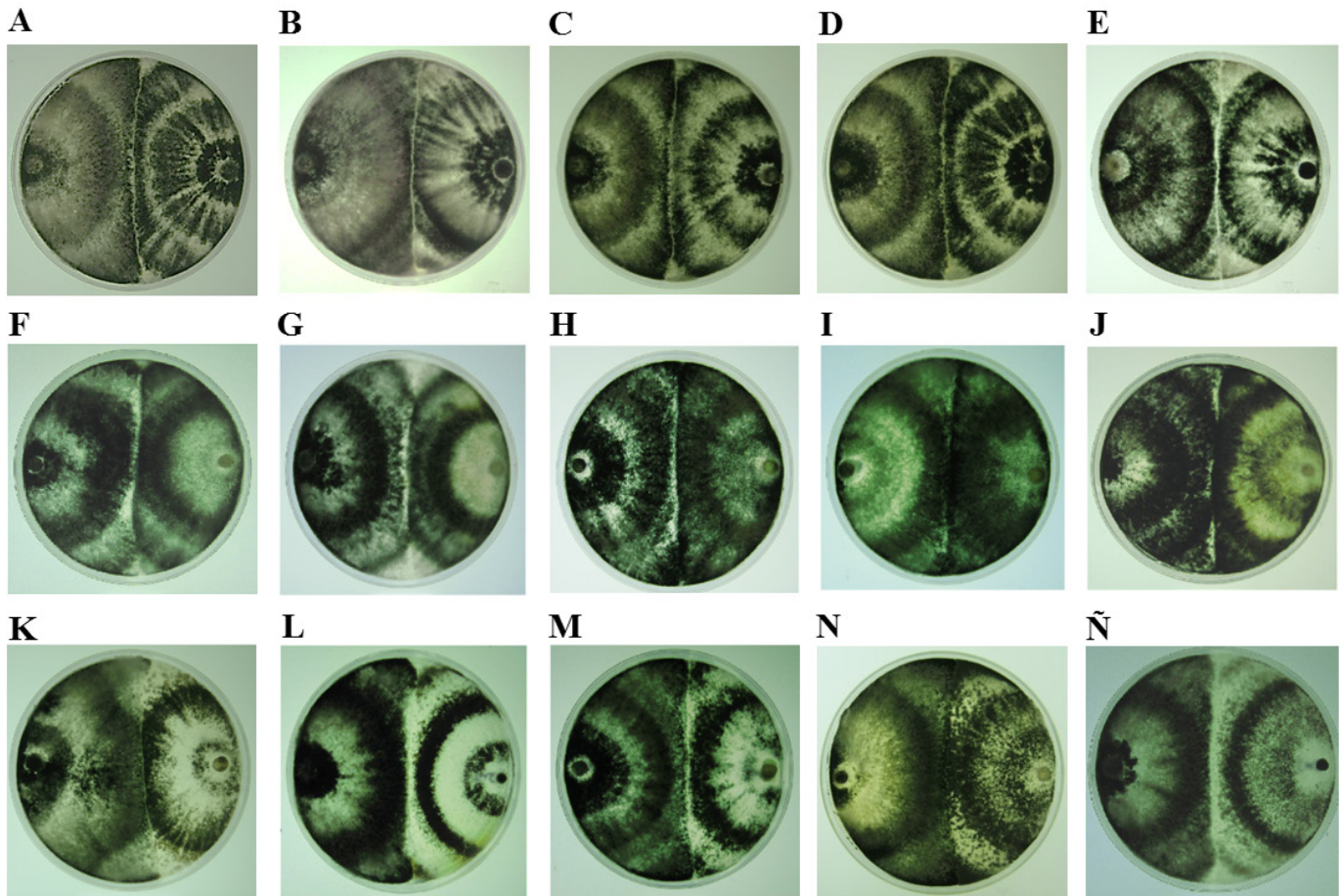


Figura 5. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma* y las cepas de referencia. A) T.13 - *T. viride*, B) T.17 - *T. viride*, C) T.75 - *T. viride*, D) T.78 - *T. viride*, E) T.90 - *T. viride*, F) T.13 - *T. asperellum* 215D, G) T.17 - *T. asperellum* 215D, H) T.75 - *T. asperellum* 215D, I) T.78 - *T. asperellum* 215D, J) T.90 - *T. asperellum* 215D, K) T.13 - *T. atroviride* IMI206040, L) T.17 - *T. atroviride* IMI206040, M) T.75 - *T. atroviride* IMI206040, N) T.78 - *T. atroviride* IMI206040, Ñ) T.90 - *T. atroviride* IMI206040. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 5. Vegetative compatibility reactions between *Trichoderma* isolates and the reference strains. A) T.13 - *T. viride*, B) T.17 - *T. viride*, C) T.75 - *T. viride*, D) T.78 - *T. viride*, E) T.90 - *T. viride*, F) T.13 - *T. asperellum* 215D, G) T.17 - *T. asperellum* 215D, H) T.75 - *T. asperellum* 215D, I) T.78 - *T. asperellum* 215D, J) T.90 - *T. asperellum* 215D, K) T.13 - *T. atroviride* IMI206040, L) T.17 - *T. atroviride* IMI206040, M) T.75 - *T. atroviride* IMI206040, N) T.78 - *T. atroviride* IMI206040, Ñ) T.90 - *T. atroviride* IMI206040. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

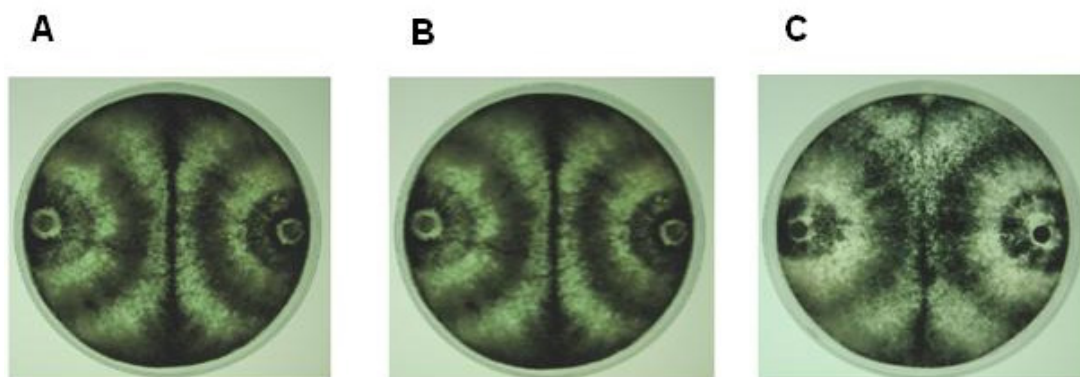


Figura 6. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma*. A) T.75 - T.78, B) T.17 - T.90, C) T.78 - T.13. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 6. Vegetative compatibility reactions between *Trichoderma* isolates. A) T.75 - T.78, B) T.17 - T.90, C) T.78 - T.13. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

Teniendo en cuenta la compatibilidad vegetativa que mostraron los aislamientos en estudio con las cepas de referencia *T. asperellum* 215D, *T. atroviride* IMI206040 y *T. viride*, se puede inferir, que estos tienen relación taxonómica con cualquiera de las tres especies antes mencionadas.

Cook y Baker (1983) con el uso de esta técnica (Cv) confirmaron la identificación taxonómica de aislados de *Trichoderma* realizada previamente por ellos, a partir de aspectos morfológicos. En relación con esto, Galdames (2001), opinó que este tipo de bioensayo (“prueba de compatibilidad”) puede ser considerado como un criterio de clasificación de las especies del género *Trichoderma*, debido a la consistencia de los resultados, al comparar el agrupamiento obtenido entre 21 cepas de *Trichoderma* spp., por técnicas moleculares (RAPD y AFLPs) y la Cv.

De forma general, esta prueba demuestra que cepas de una misma especie del hongo comparten patrones similares de compatibilidad, lo que se reduce entre especies más alejadas. Por tal motivo, puede ser considerada como una alternativa, simple y rápida para valorar la especie a que pertenece un nuevo aislado, siempre y cuando se cuente con cepas de diferentes especies correctamente identificadas molecularmente.

Desde el punto de vista práctico, es importante, ya que tiene implicación en la formulación de productos biológicos cuyo ingrediente activo es este antagonista y donde se utilicen consorcios de especies, debido a que algunos de ellos pueden inhibir al otro, sobre todo debido a liberación de compuestos no-volátiles (Lelay *et al.*, 2007). Algunas investigaciones aclaran que cuando se aplica un consorcio de microorganismos de la misma especie (relación intraespecífica) o de especies diferentes (relación interespecífica) se podría obtener mayor inhibición de los patógenos, así como proporcionarle beneficios a la planta (Moo koh *et al.*, 2018). En este sentido, Gallegos-Morales *et al.* (2022), evidenciaron compatibilidad *in vitro* entre *T. asperellum*, *T. harzianum* y *Trichoderma lignorum*; y al realizar co-aplicaciones tuvieron hasta el 86 % de rendimientos por planta, y disminución en la incidencia (71 %) y severidad por *Fusarium* sp., (59 %) en el cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.).

Variabilidad molecular de los aislamientos

Análisis RAPD

Los 11 marcadores generaron un patrón de amplificación claro y reproducible para cada aislamiento, con un total de 92 bandas reproducibles. De estas, 65 fueron polimórficas, para un 70,7 % de polimorfismo. Los iniciadores OPA-13, OPB-07, OPB-09, OPH-19 y OPJ-20 tuvieron 70 o más por ciento de polimorfismo (Tabla 3), destacándose el OPH-19 con 100 % de polimorfismo.

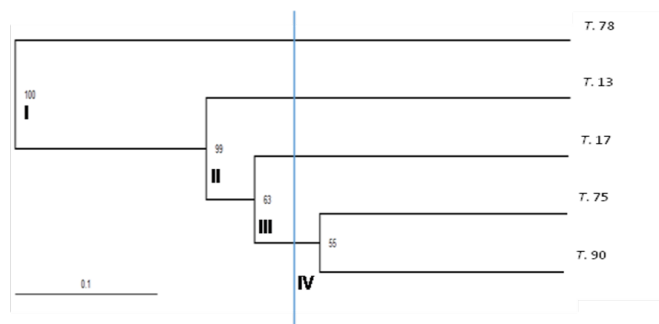
Los datos generados por los RAPD formaron cuatro grupos, una evidencia más de la variabilidad intraespecífica entre los aislados en estudio (Figura 7).

La variabilidad obtenida por RAPD entre los aislados puede ser usada para la detección de estos. El iniciador OPE-14 amplificó una banda en el aislado T.17 que lo diferencia

Tabla 3. Total de bandas generadas a partir de los aislamientos cubanos de *Trichoderma* con el uso de 11 iniciadores RAPD.

Table 3. Total of bands generated from the Cuban *Trichoderma* isolates using eleven RAPD primers.

Iniciador	No. Total de bandas	No. de bandas Polimórficas	% de Polimorfismo
OPA13	4	3	75
OPB07	10	7	70
OPB09	10	7	70
OPB10	6	4	66,7
OPE14	11	6	54,5
OPG02	6	4	66,7
OPH03	8	5	62,5
OPH18	5	3	60
OPH19	10	10	100
OPG10	10	6	60
OPJ20	12	10	83,3
Total	92	65	



Método de Jaccard

Figura 7. Agrupamiento de cinco aislados de *Trichoderma* basado en el polimorfismo por RAPD por el método de Jaccard.

Figure 7. Clustering of five *Trichoderma* isolates based on polymorphism by RAPD by Jaccard's method.

de T.13, para T.75 con el iniciador OPH-03 se produjeron tres bandas que lo diferencian de T.78, y OPH-19, produjo una banda en T.17 que lo distingue del resto de los aislados (Figura 8). Diferencias que puntualizan dicha variabilidad. Desde otro punto de vista, estos resultados tienen importancia para el diseño de cebadores específicos, para su identificación, aspecto primordial para la autenticación, protección, y monitoreo de estos en campo.

Resultados similares obtuvieron Chandulal *et al.* (2016), quienes encontraron con cinco iniciadores RAPD variabilidad intraespecífica entre diez aislados de *Trichoderma* sp., obtenidos de suelo rizosférico de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). También, Ranga *et al.* (2017) detectaron elevada variabilidad intraespecífica en nueve aislados de *Trichoderma*, con el uso de 15 iniciadores. Asimismo, coinciden con los obtenidos por Hernández *et al.* (2013), quienes con el uso de cuatro iniciadores RAPD evidenciaron variabilidad intraespecífica en diez aislados de *Trichoderma* spp. También, Hewedy *et al.* (2020) revelaron un elevado polimorfismo de 80 % de las bandas reproducibles en las cepas con siete iniciadores RAPD.

Por su parte, El_Komy *et al.* (2015), encontraron elevada variabilidad intraespecífica en 30 aislados de *T. asperellum*,

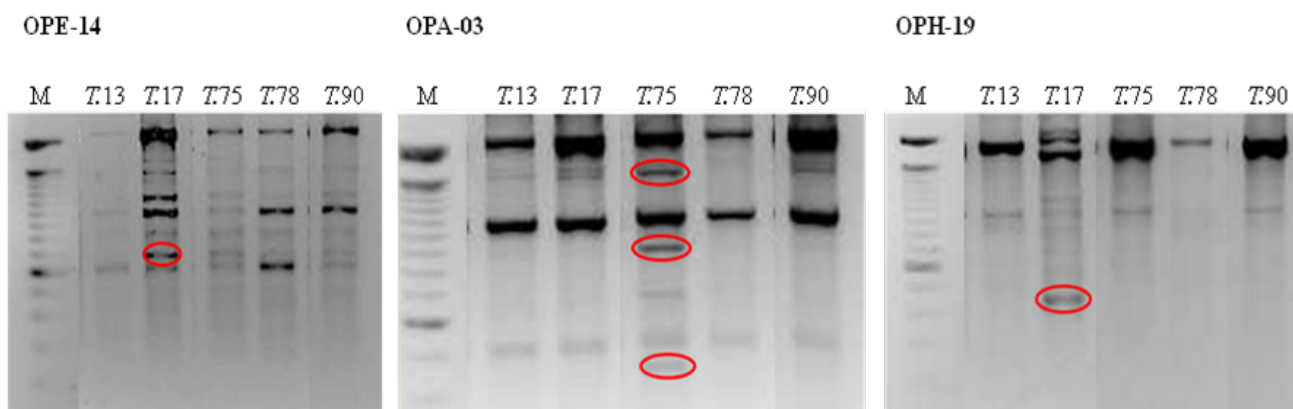


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TBE de la amplificación con cebadores RAPD. Línea 1: M (1000 pb DNA Ladder, Invitrogen, E.U.); Líneas 2-6: Aislamientos de *Trichoderma* en estudio.
Figure 8. Electrophoresis on 1.5 % agarose gel in TBE of the amplification with RAPD primers. Lane 1: M (1000pb DNA Ladder, Invitrogen, E.U.); Lanes 2-6: *Trichoderma* isolates under study.

con ocho cebadores RAPD, aunque esto no se relacionó con la actividad quitinasa y glucanasa de estas cepas. En sus investigaciones Kumar y Sharma (2011) declaran que, la variabilidad detectada con marcadores RAPD se relaciona con otros marcadores, fisiológicos o patogénicos. Los resultados del ensayo coinciden con los informado por estos autores, aunque parcialmente con los de El_Komy *et al.* (2015), ya que los aislados de *Trichoderma* cubanos, presentan marcada variabilidad enzimática (González *et al.*, 2012).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran la variabilidad entre los aislados de *Trichoderma* sobre la base de caracteres morfológicos y culturales, así como genéticos, demostrada por la compatibilidad vegetativa y marcadores RAPD.

En general, estos resultados revisten gran importancia para la identificación, autenticación, protección y monitoreo de estos, en sistemas productivos. Para su uso como futuros controladores biológicos donde la variabilidad entre estos, sea la complementación, con vistas a la obtención de productos con mayor alcance, para su implementación dentro de un manejo integrado sustentable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

La investigación se logró gracias al apoyo de una beca SEP, otorgada por México. Con ello, agradecemos al Dr. Alfredo Herrera Estrella, y a la Dra. June Simpson por su apoyo en la realización de estos estudios, a través de una estancia en sus Laboratorios, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Igualmente, agradecer a los técnicos Ing. Pedro Martínez y MSc. Katia Gil.

REFERENCIAS

- Barcellos, F.G., Hungria, M. y Pizzirani-Kleiner, A. 2011. Limited Vegetative Compatibility as a cause of Somatic Recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. Brazilian Journal of Microbiology. 42: 1625-1637.
- Bissett, J., Gams, Walter., Jaklitsch, W. y Samuels, J.G. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year. IMA Fungus. 6 (2): 263-95.
- Chandulal, K., John, Priya. y Gopal, C. 2016. Genetic Diversity of *Trichoderma* sp. obtained from tomato rhizosphere using RAPD. International Journal of Science, Environment and Technology. 5 (4): 2101-2108.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota: American Phytopathological Society. 539 p.
- Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Infante-Martínez, D., Echevarría, H.A. y Martínez-Coca, B. 2018. Manejo de hongos fitopatógenos en *Phaseolus vulgaris* L. con la aplicación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Revista de Protección Vegetal. 33 (3):1-7.
- Druzhinina, I. y Kubicek, C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J Zhejiang Univ SCI. 6B (2): 100-112.
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A. y Kubicek, C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience. 47: 55-64.
- Duarte, L.Y., Infante, M.D. y Martínez, C.B. 2021. Biocontrol of *Trichoderma* spp. strains against *Fusarium* spp. isolates from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Protección Vegetal. 36 (2):1-5.
- El_Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A. y Molan, Y.Y. 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt. Journal Plant Pathology. 31 (1): 50-60.
- El-Sobky, M.A., Fahmi, A.I., Ragaa, A.E. y El-Zanaty, A.M. 2019. Genetic Characterization of *Trichoderma* spp. Isolated from Different Locations of Menoufia, Egypt and Assessment of their Antagonistic Ability. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 1 Iss. 11 (409): 9-23.
- Takegane, E.R. 2018. Selección de cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas* para el control de *Alternaria solani* Sor. en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba.

- Galdames, R. 2001. Análisis genético-molecular de la diversidad del hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk., y del biocontrolador *Trichoderma* spp. Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias - Biotecnología de Plantas. Irapuato, Gto, México.
- Gallegos-Morales, G., Espinoza-Ahumada, C.A., Figueroa-Reyes, J., Méndez-Aguilar, R., Rodríguez-Guerra, R., Salas- Gómez, A.L. y Peña-Ramos, F.M. 2022. Compatibilidad de especies de *Trichoderma* en la producción y biocontrol de marchitez del chile. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 9: (2): e3066.
- Gams, W. y Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek C, Harman G. (eds.), p. 3-34, *Trichoderma and Gliocladium* Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, UK.
- González, I., Infante, D., Martínez, B., Arias, Y., González, N., Miranda, I. y Peteira, B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotecnología Aplicada*. 29: 12-16.
- Hapl, V., Pavlíček, A. y Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Freetree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 731-735. <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.htm>.
- Haouhach, S., Karkachi, N., Oguiba, B., Sidaoui, A., Chamorro, I., Kihal, M. y Monte, E. 2020. Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). *Microorganisms*. 8 (1455): 2-14.
- Hassan, M.M., Farid, M.A. y Gaber, A. 2019. Rapid identification of *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma longibrachiatum* using sequence characterized amplified region markers. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 29:13.
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, E., Diaz-Minguez, J., Castro, C., Monte, E. y Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1890-1898.
- Hernández, A., Jiménez, M., Arcia, A., Ulacio, D. y Méndez, N. 2013. Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro*. 25 (3): 167-174.
- Hewedy, O.A., Abdel, L.K.S., Seleiman, M.F., Shami, A., Albarakaty, F.M. y El-Meihy, R.M. 2020. Phylogenetic Diversity of *Trichoderma* Strains and Their Antagonistic Potential against Soil-Borne Pathogens under Stress Conditions. *Biology*. 9: 189.
- Infante, D., Reyes, Y., Peteira, B. y Martínez, B. 2015. Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. *Métodos en Ecología y Sistemática*. 10 (3): 41-52.
- Infante, M.D. y Martínez, C.B. 2020. Antagonismo de seis cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre *Colletotrichum* spp. *Revista de Protección Vegetal*. 35 (3): 1-8.
- Index Fungorum. [Consultado: Abril de 2021]. 2021. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/search/scientific/genus/Trichoderma/fossil/1/match/1/page/2> 1/sort//direction/asc.
- Kumar, M. y Sharma, P. 2011. Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology*. 10 (22): 4532-4543.
- Khattak, B., Saifullah, S.H., Ahmad, M., Ali, A., Junaid, M., Khan, I.A., Khan, T.A. y Hussain, M. 2018. Genetic Relatedness among the Indigenous Isolates of *Trichoderma harzianum*, using RAPD and their Nematocidal Capabilities against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agricultura*. 34: 486-493.
- Lelay, Y., Ruano-Rosa, D. y López-Herrera, C. 2007. Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H. y Petrini, O.A. 1999. Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (6): 2418-2428.
- Lübeck, M., Poulsen, K., Lübeck, P., Jensen, F. y Thrane, U. 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. (185): 129-134.
- Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*. 30 (Número Especial): 11-22.
- Moo Koh, F.A., Alejo, J.C., Ramírez, A.R., Suárez, J.T., Angulo, G. y Islas- Flores, I.R. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. *Scientia Fungorum*. 47: 37-45.
- Ortuño, N.C. y Miranda, M.C. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal Selva Andina Biosphere*. 1: 16-4.
- Pandya, J.R., Sabalpara, A.N. y Mahatma, M. 2017. Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis of Native *Trichoderma* Isolates. *Asian Journal of Applied Science and Technology*. 1 (5): 147-150.
- Ranga, R.A., Ahammed, K.S. y Patibanda, A.K. 2017. Genetic Diversity of *Trichoderma* sp. from Rhizosphere Regions of Different Cropping Systems using RAPD Markers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (7): 1618-1624.
- Rifai, A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological*. 116: 1-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- Samuels, G., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. y Kubicek, C. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycological*. 41: 1-54.
- Samuels, G., Lieckfeldt, E. y Nirenberg, H. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *Trichoderma viride*. *Sydowia*. 51 (1): 71-88.
- Samuels, G., Ismaiel, A., Bon, M., De Respinis, S. y Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycological*. 102 (4): 944-966.
- Sánchez-García, B.M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Avilés, M.A. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Cv. Montcalm. *Agrociencia*. 51: 63-79.
- Stocco, M.C. 2014. Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata.
- Watanabe, S., Kumakura, K., Kato, H., Iyozumi, H., Togawa, M. y Nagayama, K. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT1, a biological control agent against seed borne pathogens of rice. *Journal of General Plant Pathology*. 71: 351-356.



Análisis sensorial, textural y actividad antioxidante de queso añejo de Zacazonapan durante la maduración

Sensory, textural analysis and antioxidant activity of añejo Zacazonapan cheese during ripening

Torres-Salas Verenice^{1*}, Hernández-Montes, Arturo¹ y Hernández-Rodríguez Blanca E.²

¹ Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 carretera México-Texcoco, CP 56230 Chapingo, Estado de México, México; sensoarturo@gmail.com.

² Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, CP 56230 Chapingo, Estado de México, México; blancaeli_hr@yahoo.com.mx.

ABSTRACT

Proteolysis during cheese ripening contributes to biopeptide generation and changes in sensory and textural characteristics. The aim of this work was to determine antioxidant capacity, as well as changes in the sensorial and textural characteristics of cheese from Zacazonapan, during ripening (0, 30, 95 and 180 d). At 95 d, the extracts of evaluated cheeses presented the highest soluble protein content. The degree of protein hydrolysis stood out at 95 (7.43 ± 0.34) and 180 d of ripening (6.44 ± 0.31 %). The DPPH free radical uptake was higher at 30 and 180 d (18.70 ± 0.48 and 19.92 ± 0.48 %, respectively), while the highest oxygen radical absorption capacity (ORAC) was recorded at 180 d. Concerning the sensory characteristics, cheeses with 180 d presented attributes such as bitter residual taste, foot odor, hardness, pungency, ripened cheese flavor and porous appearance; in addition to a hard and less cohesive texture.

Keywords: Zacazonapan; antioxidant activity; flash profile; texture; ripening.

RESUMEN

La proteólisis durante la maduración de los quesos contribuye a la generación de biopéptidos, y a cambios en las características sensoriales y texturales. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antioxidante, así como los cambios en las características sensoriales y texturales del queso añejo de Zacazonapan, durante la maduración (0, 30, 95 y 180 d). A los 95 d los extractos de los quesos evaluados presentaron el mayor contenido de proteína soluble. El grado de hidrólisis de proteínas destacó a los 95 (7.43 ± 0.34 %) y 180 d de maduración (6.44 ± 0.31 %). La captación del radical libre DPPH fue mayor a los 30 y 180 d (18.70 ± 0.48 y 19.92 ± 0.48 %, respectivamente), mientras que la mayor capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se registró a los 180 d. Con respecto a las características sensoriales, los quesos con 180 d presentaron atributos como sabor residual amargo, olor a pies, dureza, pungencia, sabor a queso madurado y apariencia porosa; además de una textura dura y menos cohesiva.

Palabras clave: Zacazonapan; actividad antioxidante; perfil flash; textura; maduración.

INTRODUCCIÓN

Durante la maduración de los quesos, la proteólisis contribuye a la generación de péptidos, los cuales pueden ejercer alguna actividad biológica, ya sea antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, opioide, antiangiogénica, etc. (Santiago-López *et al.*, 2018; Rafiq *et al.*, 2021). Los péptidos con actividad antioxidante son capaces de captar radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Khan *et al.*, 2019). Este tipo de péptidos ha sido reportado en varios quesos alrededor del mundo (Dias da Silva *et al.*, 2019; Kariyawasam *et al.*, 2019; Timón *et al.*, 2019; Banihashemi *et al.*, 2020; Turan y Durak, 2022) y en el caso de quesos mexicanos las investigaciones más recientes se han realizado en quesos tales como el queso crema de Chiapas, el fresco, el cocido (Aguilar-Toalá *et al.*, 2022) y el panela (López-Villafaña *et al.*, 2023).

Por otro lado, la maduración permite que los quesos desarrollen características sensoriales determinadas en gran medida por los procesos bioquímicos que se llevan a cabo y por los factores que impactan la textura. Estos factores incluyen a los glóbulos de grasa, agua, minerales, bacterias y solutos disueltos como la lactosa, el ácido láctico, las sales solubles y los péptidos ocluidos dentro de la matriz de proteína, entre los cuales varias fuerzas moleculares (puentes de hidrógeno y disulfuro) pueden influir en la funcionalidad del queso (Lamichhane *et al.*, 2018; Domingues *et al.*, 2019). Las diferencias sensoriales entre productos pueden ser descritas y cuantificadas mediante un perfil sensorial, como el perfil Flash (Domingues *et al.*, 2019).

El queso añejo de Zacazonapan es un alimento tradicional mexicano producido en el suroeste del Estado de México, al ser un queso artesanal se elabora a pequeña escala, con leche cruda, bajo técnicas tradicionales y goza de prestigio social local (Aguilar-Toalá *et al.*, 2022). Investigaciones recientes en el queso añejo de Zacazonapan se han centrado en las emociones de sus consumidores (Torres-Salas y Hernández-Montes, 2021b), en los valores humanos (Torres-Salas y Hernández-Montes, 2021a), las comunalidades de significado para el queso (Torres-Salas y Hernández-Montes, 2020) y en la actividad antimicrobiana de sus extractos solubles (Torres-Salas, *et al.*, 2021). Sin embargo, no existe información sobre la producción de péptidos con actividad antioxidante, ni de las características sensoriales y texturales desarrolladas en

este queso durante la maduración. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivos realizar un análisis composicional del queso añejo de Zacazonapan, determinar el grado de hidrólisis de las proteínas y la actividad antioxidante que poseen los péptidos generados en el transcurso de la maduración. Además, en este periodo se evaluaron los cambios en los atributos sensoriales del queso y sus características texturales instrumentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos analíticos

El reactivo de Bradford, albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), L-leucina, 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés), 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH, por sus siglas en inglés), fluoresceína y trolox correspondieron a la empresa Sigma-Aldrich (Minnesota, USA). El ácido 2, 4, 6-trinitrobenzeno-1-sulfónico (TNBS, por sus siglas en inglés) de la marca Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Suiza).

Obtención de muestras

Piezas de queso (un kilogramo) se obtuvieron de dos queserías de Zacazonapan, Estado de México, México (codificados como A y B). Las piezas para las tres repeticiones se elaboraron en días consecutivos, cada pieza se obtuvo de un lote de leche cuajada en la misma tina. Posteriormente, se almacenaron a 15 °C y una humedad relativa de 85 %, para muestrearse durante la maduración a los 0, 30, 95 y 180 d.

Análisis fisicoquímicos del queso

El pH se determinó con un potenciómetro Conductronic pH120 (Conductronic, Puebla, México) como lo describe Villegas (2004) y la actividad de agua (a_w) con el método reportado por Öztürk y Akin (2021b) mediante un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Washington, USA). El análisis composicional se realizó con un analizador FoodScan™ Lab (FOSS Analytical AB, Hillerød, Dinamarca). Las determinaciones se realizaron por triplicado para los quesos de ambas fábricas, en los cuatro tiempos de maduración (0, 30, 95 y 180 d).

Extracción de compuestos solubles en agua

La extracción se realizó como lo describen Pritchard *et al.* (2010), con modificaciones. 250 g de queso se homogeneizaron con 750 mL de agua destilada durante 5 min en una licuadora (Osterizer, Wisconsin, USA). A continuación, la mezcla se agitó a 150 rpm durante 1 h a 40 °C en una incubadora orbital (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). El pH se ajustó a 4.6 con HCl 1 M y la mezcla se centrifugó a 8801 g durante 10 min a 4 °C y se descartó tanto la capa superior de grasa como el sedimento. El extracto acuoso se filtró por gravedad a través de una capa de algodón y posteriormente utilizando papel Whatman No. 42, en condiciones de vacío. Los extractos se almacenaron a -20 °C y antes de cada prueba se centrifugaron a 3438 g durante 10 min a 4 °C (Centrifuga

Eppendorff 5810, Hamburgo, Alemania) y se filtraron usando papel Whatman 42.

Determinación de proteína soluble en extractos acuosos

La proteína soluble se cuantificó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). Una alícuota de 50 µL del extracto acuoso se mezcló con 1.5 mL de reactivo de Bradford. Después de 5 min, la absorbancia se leyó a 595 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, USA). En el blanco se sustituyó el extracto por agua destilada. Bajo las mismas condiciones se preparó una curva estándar de BSA (0.1 - 1.4 mg/mL) y cada determinación se realizó por triplicado.

Determinación de grado de hidrólisis de proteínas

Este parámetro se determinó como lo describe Adler-Nissen (1979), con algunas modificaciones. Alícuotas de 64 µL de extracto acuoso se mezclaron con 1 mL de tampón de fosfato de sodio 0.2125 M a pH 8.2 y 0.5 mL de TNBS al 0.2 % (v/v). La mezcla se agitó e incubó en baño de agua (OVAN TL60E, Suministro Grupo Esper, S. L., USA) durante 30 min a 50 °C, bajo condiciones de oscuridad. Concluido el tiempo se adicionó 1 mL de Na₂SO₃ 0.1 M para detener la reacción y se dejó reposar 10 min. En el blanco se sustituyó la muestra por agua destilada. Bajo las mismas condiciones se construyó una curva estándar de L-leucina (0 - 6 mM). La absorbancia se midió a 420 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, USA) y cada determinación se realizó por triplicado.

La hidrólisis total se realizó pesando 0.5 g del queso al tiempo cero de maduración y se adicionaron 2.5 mL de HCl 6 N, la mezcla de reacción se incubó a 100 °C durante 24 h (EC33, Ríos Rocha S. A., Ciudad de México, México). Después se adicionaron 2.5 mL de NaOH y la mezcla se filtró a través de papel Whatman No. 1. Al sobrenadante se aplicó la metodología descrita para los extractos acuosos. El porcentaje de grado de hidrólisis (% GH) se calculó con la ecuación 1:

$$\% GH = \frac{NH_{2tx} - NH_{2t0}}{NH_{2HT} - NH_{2t0}} \times 100 \quad (1)$$

Donde: NH_{2tx} = cantidad de grupos α-amino libres al tiempo x de maduración, NH_{2t0} = cantidad de grupos α-amino libres al tiempo 0 de maduración y NH_{2HT} = cantidad de grupos α-amino libres totales en la muestra de queso a los 0 d de maduración.

Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante Captación del radical libre DPPH

La determinación se realizó como lo describe Hernández-Galán *et al.* (2017), con modificaciones. Un volumen de 0.5 mL de extracto acuoso (proteína 0.3 mg/mL) o agua destilada (blanco), se mezcló con 1.5 mL de DPPH 0.125 mM (en metanol al 80 % v/v) y se dejó reposar durante 60 min en la oscuridad. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 3483 g durante 5 min a 4 °C (Centrifuga Eppendorff 5810, Ham-

burgo, Alemania) y la absorbancia se leyó a 515 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, Massachusetts, USA). El porcentaje de captación del radical DPPH se calculó con la ecuación 2:

$$\text{Captación del DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Extracto}}}{A_{\text{Blanco}}} \times 100 \quad (2)$$

Donde A_{Blanco} = absorbancia del blanco y A_{Extracto} = absorbancia del extracto soluble.

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La determinación se realizó según el método descrito por Dávalos *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Un volumen de 25 μL del extracto acuoso, o tampón de fosfato de potasio 75 mM a pH 7.4 en el caso del blanco y el control, se mezcló con 150 μL de fluoresceína 1.4 μM (diluida 1:1000 con tampón de fosfato de potasio 75 mM, pH 7.4). La mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C, enseguida se añadieron 25 μL de AAPH 0.15 M. Una vez iniciada la reacción, las lecturas de fluorescencia a 37 °C se tomaron en intervalos de 1 min durante 1 h, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 535 nm de emisión, mediante un equipo BioTek Synergy 2 (Winooski, Vermont, USA). Bajo las mismas condiciones se preparó una curva de trolox (5 a 100 μM). Los cálculos de las áreas bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia (AUC) de los extractos acuosos y curva estándar de trolox, se determinaron con el software Gen5™ (1.11 versión 2005, Winooski, Vermont, USA) del equipo BioTek Synergy 2. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como μM equivalentes de trolox/mL de extracto.

Perfil flash del queso añejo de Zacazonapan

El método utilizado fue el descrito por Dairou y Sieffermann (2002), con modificaciones. Para la prueba se reclutaron a 17 estudiantes del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). En la primera sesión, a cada panelista se le presentaron las muestras del queso A y del B con 0, 30 y 180 d de maduración. Las seis muestras (dos cubos de queso de 1 x 1 x 1.5 cm por muestra) fueron presentadas de forma aleatoria y simultánea en vasos de plástico del No. 0, codificados con números aleatorios de tres dígitos. Posteriormente, a los panelistas se les pidió crear una lista de atributos para diferenciar las muestras. A continuación, se socializó y consensó la información en una lista de 14 atributos (color amarillo, apariencia porosa, olor a pies, aroma a leche ácida, firmeza o dureza (al presionar el queso con las muelas), desmoronable (en boca), arenosidad o granulosis, humedad, sabor salado, sabor ácido, sabor a queso madurado, pungencia o picor, sabor residual amargo, duración del sabor en la boca). En una segunda sesión, a cada panelista se le presentaron nuevamente las seis muestras simultáneamente (dos cubos de queso de 1 x 1 x 1.5 cm por muestra) y se le pidió jerarquizarlas para cada atributo utilizando una escala ordinal del 1 al 6, considerando 6 como la muestra con la mayor intensidad del atributo. Los panelistas tuvieron disponible agua y galletas habaneras clásicas (Gamesa®) para enjuagarse la boca entre muestras.

Análisis de perfil de textura (APT)

El APT se realizó con el método señalado por Hernández-Morales *et al.* (2010), mediante un analizador de textura TA Xt2i (Stable Micro Systems; Surrey, UK) con una celda de carga de 5 kg. Las muestras (cilindros de 10 mm de diámetro y de altura) se comprimieron uniaxialmente a una deformación del 50 % utilizando un disco de acrílico de 35 mm de diámetro (A/BE35) y una velocidad de pre-ensayo y post-ensayo del cabezal de 1 mm/s. Los datos de la doble compresión permitieron obtener curvas de fuerza/tiempo (Figura 1), a partir de las cuales se calcularon los parámetros del APT como: la dureza que es el pico de fuerza (F) del área uno (A1) de la primera compresión, la adhesividad representa el trabajo necesario para retirar el disco que comprime la muestra y corresponde al área tres (A3). La cohesividad definida como la propiedad que le permite al queso permanecer unido después de una primera compresión y se calcula como el cociente del área dos entre el área uno (A2/A1). La elasticidad se refiere a la habilidad del queso para retornar a su altura original después de una primera compresión y se calcula dividiendo la distancia dos entre la uno (D2/D1). Finalmente, la masticabilidad se refiere al trabajo necesario para realizar una doble compresión y corresponde al producto de $F * (A2/A1) * (D2/D1)$ (Rahman *et al.*, 2021).

Análisis estadístico

El diseño aplicado fue un completamente al azar con arreglo factorial, el cual consideró dos factores: queso (dos niveles A y B) y tiempo de maduración (cuatro niveles 0, 30, 95 y 180 d). Las medias se compararon con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) con $\alpha = 5 \%$, usando el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., Carolina del Norte, USA). En el perfil flash se utilizó un diseño completamente al azar para seleccionar panelistas que mostrarán diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la mayoría de los atributos,

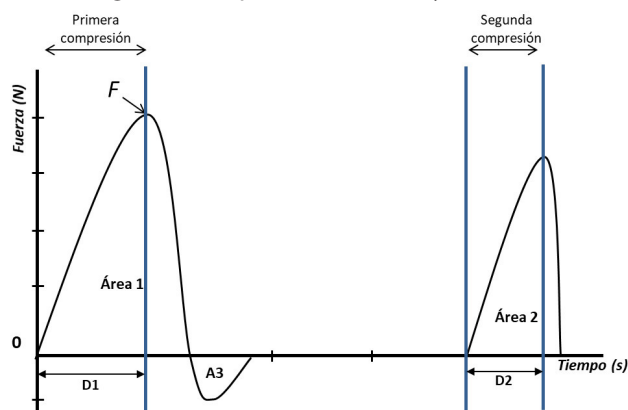


Figura 1. Curva de análisis de perfil de textura (APT). Los cálculos de las propiedades texturales: dureza = F (N), adhesividad = $A3$ (N·s), Cohesividad = $A2/A1$ (adimensional), elasticidad = $D1/D2$ (adimensional) y masticabilidad = dureza x cohesividad x elasticidad (N). Modificado de Rahman *et al.* (2021).

Figure 1. Texture profile analysis curve (TPA). Calculations of textural properties: hardness = F (N), stickiness = $A3$ (N·s), Cohesiveness = $A2/A1$ (dimensionless), elasticity = $D1/D2$ (dimensionless) and chewiness = hardness x cohesiveness x elasticity (N). Modified from Rahman *et al.* (2021).

mediante el programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Con los datos de los panelistas seleccionados se realizó un análisis procrusteano generalizado (APG) mediante el programa XLSTAT versión 2014 (Addinsoft, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fisicoquímico del queso

El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a los factores queso, tiempo de maduración y su interacción. En la figura 2 se muestran las variables de respuesta con diferencia significativa respecto al factor queso, en este caso, el queso B registró los mayores contenidos en proteína (28.33 %), sólidos totales (64.74 %) y sal (2.28 %). Esta última variable se asocia con la reducción de la actividad de agua (a_w) que, a su vez, regula el crecimiento microbiano afectando la actividad enzimática. En la maduración, la actividad enzimática sobre las proteínas es determinante en el desarrollo de compuestos del sabor y en la formación de péptidos de alto y mediano peso molecular, así como en la presencia de aminoácidos libres (Fox *et al.*, 2017; Tekin y Hayaloglu, 2022).

Por otra parte, el queso A presentó el mayor porcentaje de grasa (27.80 %) y de humedad (37.92 %) (Figura 2). Esta última variable se encuentra relacionada con las etapas del proceso de elaboración del queso, por ejemplo, las veces que la cuajada se corta y se drena, así como el número de veces que es molida antes de colocarse en los moldes (Hernández-Morales *et al.*, 2010).

Las variables que presentaron diferencia significativa, respecto al factor tiempo de maduración, se muestran en la Figura 3. La proteína en el tiempo 180 d presentó un incremento del 10.8 % comparado con el tiempo 0 d. Respecto al contenido de grasa se observó el mayor valor a los 180 d (29.59 %). En consecuencia, los sólidos totales incrementaron de 54.02 a 71.23 % durante el transcurso de la maduración.

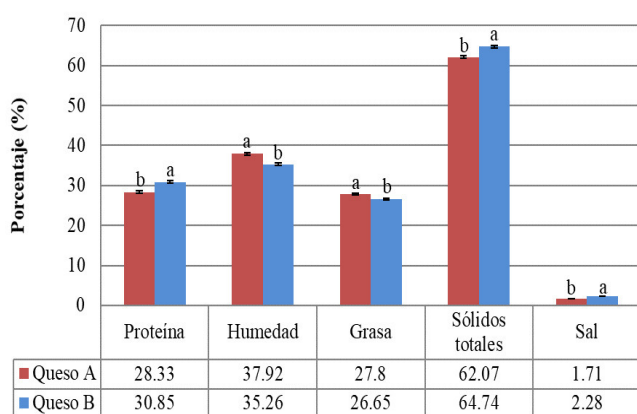


Figura 2. Composición de los quesos A y B. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) respecto al factor queso. Las letras a y b indican diferencia entre quesos.

Figure 2. Composition of cheeses A and B. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) with respect to cheese factor. Letters a and b indicate difference between cheeses.

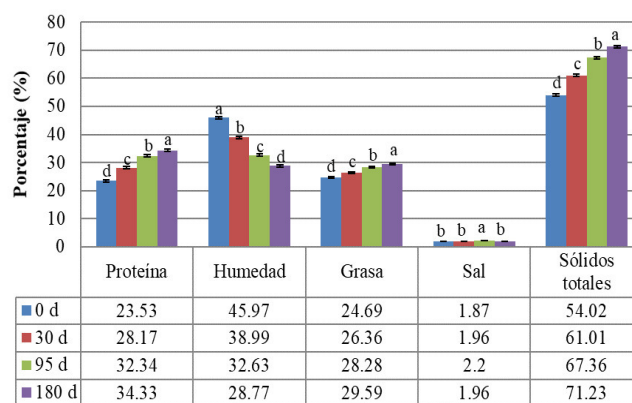


Figura 3. Composición de los quesos A y B. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) respecto al tiempo de maduración (0, 30, 95 y 180 d). Las letras a, b, c y d indican diferencia entre tiempos.

Figure 3. Composition of cheeses A and B. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) regarding the ripening time (0, 30, 95 and 180 d). The letters a, b, c and d indicate difference between times.

Por otra parte, la humedad disminuyó 1.6 veces entre el tiempo inicial y el final de la maduración. Este comportamiento es similar al reportado en queso Provolone, donde la humedad promedio inicial fue 45.70 % y decreció hasta 34.73 % a los 270 d (Manzo *et al.*, 2019). La tendencia en las diversas variables de respuesta puede explicarse considerando que la elaboración de queso constituye un proceso de deshidratación, el cual está determinado por factores como la temperatura, sinéresis, acidificación de la pasta, trabajo mecánico, adición de sal y la maduración del queso. Estos factores favorecen la concentración de los principales componentes de la leche (proteína y grasa) y la pérdida de agua (Fox *et al.*, 2017; Tekin y Hayaloglu, 2022).

Referente a la interacción de factores queso-tiempo de maduración, el pH en el queso A disminuyó hasta 5.26 a los 30 d (Figura 4), mientras que en el queso B permaneció constante entre 5.31-5.39 (Figura 4). El descenso del pH está asociado con la lactosa residual, la cual es metabolizada en ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Otros factores implicados en el comportamiento del pH son la relación ácido láctico y compuestos amortiguadores formados durante la proteólisis en el queso, así como la desaminación de aminoácidos y la conversión de ácidos grasos a metilcetonas (Manzo *et al.*, 2019; Ruvalcaba-Gómez *et al.*, 2020; Tekin y Hayaloglu, 2022).

Otra variable de respuesta importante durante la maduración es la actividad de agua (a_w), la cual debe mantenerse en un mínimo de 0.92 para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en el queso (Fox *et al.*, 2017). En el queso añejo de Zacazonapan al finalizar la maduración (180 d) la a_w disminuyó a 0.93 en el queso A y 0.90 en el queso B (Figura 4). Este comportamiento ha sido observado en queso Tulum, el cual presentó una a_w de 0.942 a los siete días de elaboración, mientras que a los 180 d de maduración fue de 0.888 (Öztürk *et al.*, 2021b), los autores relacionaron este cambio con la disminución de la humedad. Por otra parte, el contenido de sal afecta la a_w

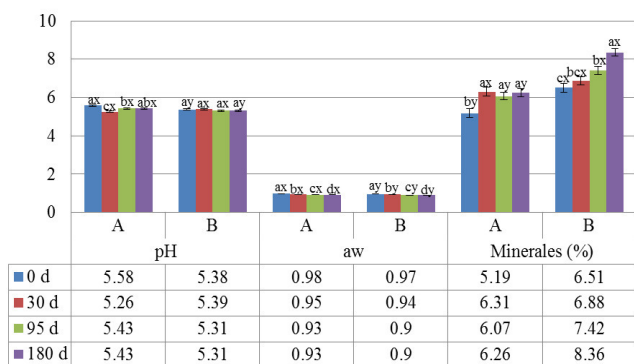


Figura 4. pH, actividad de agua (a_w) y minerales de los quesos A y B a los 0, 30, 95 y 180 d de maduración. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) para la interacción de factores queso y tiempo de maduración. Las letras a, b, c y d indican diferencia entre tiempos; x, y, indican diferencia entre quesos.

Figure 4. pH, water activity (a_w) and minerals of cheeses A and B at 0, 30, 95 and 180 d of ripening. The results are reported as mean values (\pm standard error) with significant differences (DMS, $p \leq 0.05$) for the interaction of cheese factors and ripening time. The letters a, b, c and d indicate difference between times; x, y, indicate difference between cheeses.

ya que al incrementarse promueve las interacciones agua-proteína, por el efecto "salting-in" que permite la hidratación e hinchazón de la matriz de caseína. La a_w también disminuye por la hidrólisis de enlaces peptídicos, donde se liberan dos grupos cargados ($\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$) que interactúan con el agua libre del queso (McSweeney y Sousa, 2000; Lamichhane *et al.*, 2018).

El porcentaje de minerales se incrementó conforme transcurrió la maduración, el queso B presentó los valores más altos entre 6.51 - 8.36 % (Figura 4). Cabe destacar que, el contenido de minerales es afectado por la acidificación, por ejemplo, controla la velocidad de disolución del fosfato de calcio coloidal de las micelas de caseína (Ruvalcaba-Gómez *et al.*, 2020).

Contenido de proteína soluble en extractos

El contenido de proteína soluble es una medida de la proteólisis primaria llevada a cabo durante la maduración del queso (Álvarez *et al.*, 2022). El análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a la interacción de queso y tiempo de maduración. Los valores más altos se presentaron a los 95 d, siendo 1.24 y 0.88 mg/mL para el queso A y B, respectivamente, los cuales disminuyeron con el transcurso de la maduración (Figura 5). Esto concuerda con lo encontrado por Alonzo-Paz *et al.* (2016) en extractos acuosos de queso Cotija, cuyo contenido de proteína a los 8 d fue de 0.54 mg/mL y disminuyó a los 90 d de maduración a 0.24 mg/mL. Por otra parte, autores señalan un incremento de la proteína soluble en queso Gouda, en este caso al tiempo 0 se observó un 0.249 mg/mL de proteína soluble y al finalizar la maduración de 0.261 mg/mL (Álvarez *et al.*, 2022). Algunos autores asocian este comportamiento, al incremento o disminución en la liberación de péptidos hidrófobos, los cuales modifican el perfil de solubilidad del contenido proteínico (Sarmadi y Ismail, 2010; Alonzo-Paz *et al.*, 2016).

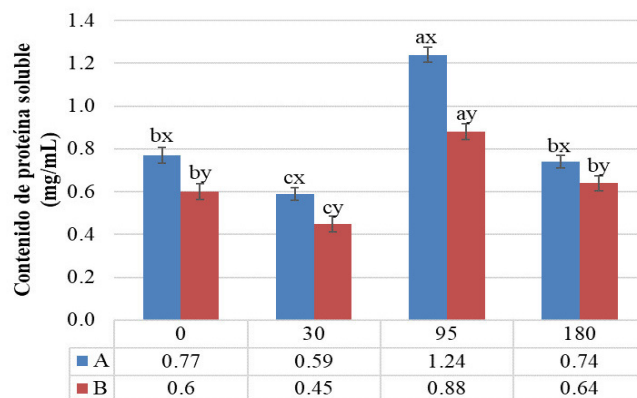


Figura 5. Proteína soluble (mg/mL) en extractos de queso añejo de Zacazonapan durante la maduración. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) para la interacción queso-tiempo de maduración. Las letras a, b, y c indican diferencia entre tiempos; x, y, indican diferencia entre quesos.

Figure 5. Soluble protein (mg/mL) in extracts of añejo Zacazonapan cheese during ripening. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) for the cheese-ripening time interaction. The letters a, b and c indicate difference between times; x, y, indicate difference between cheeses.

Grado de hidrólisis de proteínas

El grado de hidrólisis presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al tiempo de maduración, siendo de 7.43 y 6.44 % a los 95 y 180 d de maduración, respectivamente (Figura 6). Esta tendencia al incremento en el grado de hidrólisis de proteínas durante la maduración ha sido reportado en queso de cabra (Espinosa-Pesqueira *et al.*, 2018) y en queso Gouda (Álvarez *et al.*, 2022).

El incremento presentado en la proteólisis del queso añejo de Zacazonapan se considera bajo, por encontrarse en un intervalo del 1 al 10 % (Vioque *et al.*, 2001). En queso Cotija se ha reportado un grado de hidrólisis inicial de 7.89 % y en el transcurso de 90 d se incrementó a un 25 %. Cabe destacar que, este comportamiento se asocia con factores referentes al procesamiento del queso, como la aplicación de tratamiento térmico, adición de cultivos iniciadores, uso de leche cruda y la maduración (Aguilar-Toalá *et al.*, 2022). En específico, la microbiota presente en cada tipo de queso impacta la actividad enzimática; particularmente, porque utiliza a las proteínas como fuente de nitrógeno y genera la liberación de péptidos y aminoácidos a partir de la matriz proteica para garantizar su crecimiento (Matar *et al.*, 1996; Aguilar-Toalá *et al.*, 2022; Turan y Durak, 2022).

Actividad antioxidante

Captación del radical libre DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos acuosos por captación del radical libre DPPH se muestra en la figura 7, el análisis estadístico indicó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto al factor tiempo de maduración, siendo los quesos con 30 y 180 d los que presentaron los mayores porcentajes (18.70 y 19.92 %, respectivamente). Este porcentaje es superior al reportado en queso Gouda, el cual inició con 6 % y tuvo un incremento de 0.6 unidades al concluir los 90

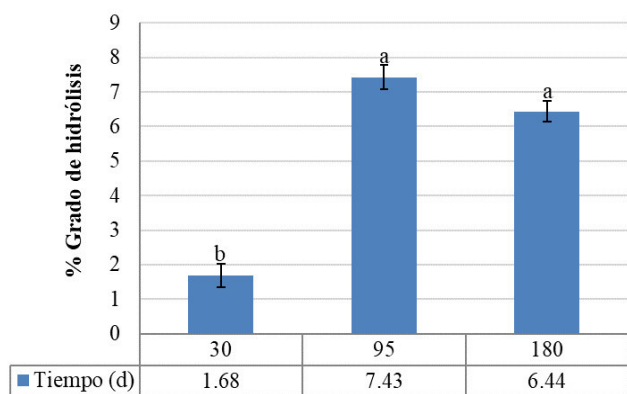


Figura 6. Porcentaje de grado de hidrólisis de queso añejo de Zacazonapan. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) para el tiempo de maduración. Las letras a y b indican diferencia entre tiempos.

Figure 6. Añejo Zacazonapan cheese degree of hydrolysis percentage. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) for ripening time. Letters a and b indicate difference between times.

d de maduración, los autores argumentan que la estructura de los aminoácidos presentes en los péptidos no permitió la captación del radical DPPH (Álvarez *et al.*, 2022). Un comportamiento similar fue reportado en queso Domiati, cuya capacidad de captar el radical DPPH alcanzó un máximo a los 45 d y decreció a los 90 d de maduración (Taha *et al.*, 2020).

Öztürk y Akin (2018) señalan que la capacidad antioxidante se incrementa al transcurrir el tiempo de maduración, en el caso de queso Tulum al día 0 se observó un 13.25 % y al cabo de 120 d el porcentaje de captación del radical DPPH fue de 30.96 %. Por otro lado, Yang *et al.* (2021) han reportado en queso Cheddar un incremento de la capacidad antioxidante a los 5 meses de maduración (55.9 %) y un posterior decremento a los 9 meses (48.53 %). Este comportamiento se asocia con la proteólisis generada durante la maduración, en la cual los péptidos se liberan, acumulan y finalmente se degradan a aminoácidos, por lo que durante una maduración prolongada pueden generarse fragmentos peptídicos sin actividad biológica (Öztürk y Akin, 2021a; Baptista y Gigante, 2020).

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) presente en los extractos solubles del queso añejo de Zacazonapan se muestra en la Figura 8, el análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la interacción de factores queso-tiempo de maduración. El método utilizado para determinar la actividad antioxidante presenta un comportamiento similar a lo reportado previamente en la captación del DPPH. La capacidad de absorber radicales peroxilo de los péptidos presentes en los extractos fue de 668.5 y de 1608.8 μM equivalentes de trolox/ mL de extracto al tiempo 0, para los quesos A y B, el cual aumentó a los 180 d hasta 8119.3 y 6474.5 μM equivalentes de trolox/ mL de extracto, respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados para queso crema de Chiapas (185.6 – 311.1 μM

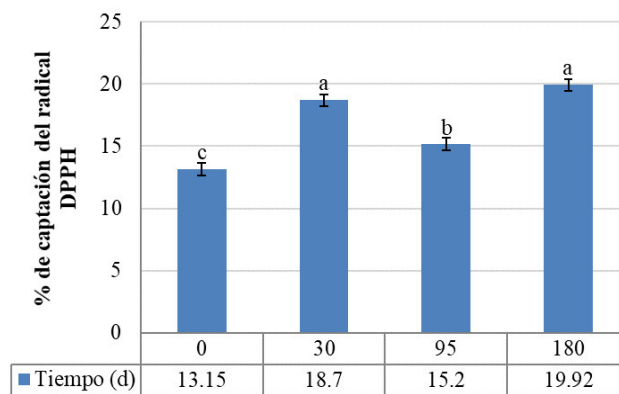


Figura 7. Porcentaje de captación del radical DPPH. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) respecto al tiempo de maduración. Las letras a, b y c indican diferencia entre tiempos.

Figure 7. DPPH radical scavenging percentage. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) regarding ripening time. The letters a, b and c indicate difference between times.

equivalentes de trolox/ mL de extracto), queso fresco (158.8 – 176.1 μM equivalentes de trolox/ mL de extracto soluble) y queso cocido (159.0 – 23.9 μM equivalentes de trolox/ mL de extracto soluble), con menor tiempo de maduración entre 10 - 20 d (Aguilar-Toalá *et al.*, 2022). Adicional a la dinámica de los péptidos durante el transcurso de la maduración, Hernández-Ledesma *et al.* (2005) señalan una elevada actividad antioxidante de péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de α -lactoalbumina y β -lactoglobulina, relacionada con la presencia de aminoácidos tales como el Trp, la Tyr y la Cys, los cuales son donantes de hidrógeno para los radicales $\text{ROO}\cdot$. Los primeros dos aminoácidos promueven la formación de radicales indoilo y fenoxilo más estables, mientras que la Met puede ser oxidada a sulfóxido de Met.

Perfil flash del queso añejo de Zacazonapan

A partir del análisis estadístico se seleccionaron 10 atributos para describir las muestras y 15 panelistas, por su capacidad de discriminación entre muestras, expresada en el mayor número de variables de respuesta significativas. El análisis de componentes principales (ACP) indicó que, la variabilidad total que explican los dos primeros componentes fue de 89.13 %, en el componente uno (CP1, 67.04 %) las cargas más importantes incluyeron a los atributos de pungencia o picor, sabor a queso madurado, firmeza o dureza y apariencia porosa. En el componente dos (CP2, 22.10 %) las cargas más importantes las presentaron los atributos de color amarillo, arenosidad o granulosidad, desmoronable (en boca), aroma a leche ácida (Cuadro 1).

Los atributos sensoriales como el aroma, sabor, color, textura y apariencia son factores determinantes en la aceptabilidad de los quesos madurados (Khattan *et al.*, 2019). En la Figura 9 se observa la distribución de los quesos de acuerdo a los atributos consensuados, los quesos con una maduración de 180 d se asociaron con atributos como: sabor residual amargo, olor a pies, firmeza o dureza, pungencia o picor,

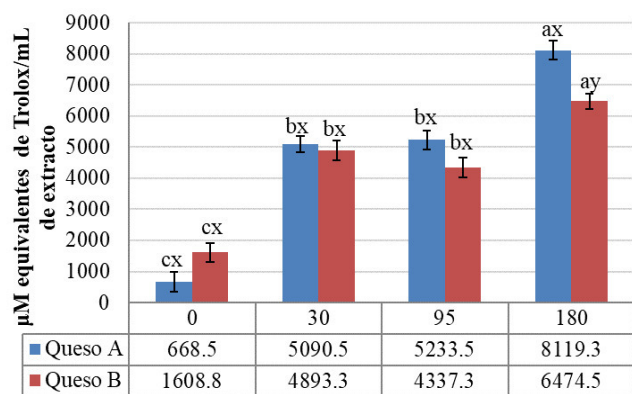


Figura 8. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Los resultados se reportan como valores promedio (\pm error estándar) con diferencia significativa (DMS, $p \leq 0.05$) respecto para la interacción queso-tiempo de maduración. Las letras a, b y c indican diferencia entre tiempos; x, y, indican diferencia entre quesos.

Figure 8. Oxygen radical absorption capacity. The results are reported as mean values (\pm standard error) with a significant difference (DMS, $p \leq 0.05$) regarding cheese-ripening time interaction. The letters a, b and c indicate difference between times; x, y, indicate difference between cheeses.

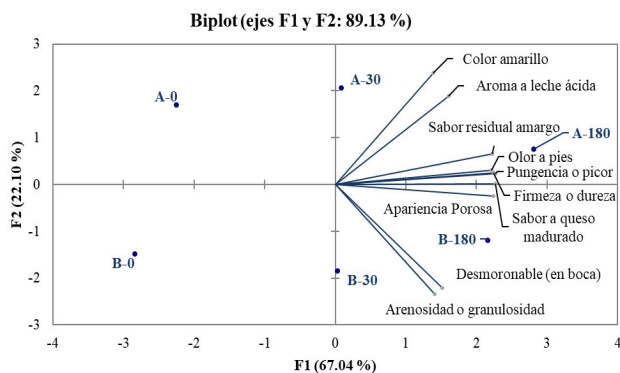


Figura 9. Distribución de los quesos A y B con 0, 30 y 180 días de maduración de acuerdo con los atributos consensuados.

Figure 9. Distribution of A and B cheeses with 0, 30 and 180 days of ripening according to agreement with consensual attributes.

Cuadro 1. Cargas de los atributos sensoriales para los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2).

Table 1. Charges of sensory attributes for the first two principal components (PC1 and PC2).

Atributo sensorial	CP1	CP2
Color amarillo	0.607	0.791
Apariencia porosa	0.983	-0.084
Olor a pies	0.970	0.103
Aroma a leche ácida	0.705	0.630
Firmeza o dureza	0.984	0.082
Desmoronable (en boca)	0.665	-0.733
Arenosidad o granulosidad	0.618	-0.775
Sabor a queso madurado	0.993	0.003
Pungencia o picor	0.995	0.076
Sabor residual amargo	0.974	0.216

sabor a queso madurado y apariencia porosa; características opuestas a los quesos frescos. Las características desarrolladas en sabor y aroma, durante la maduración, se asocian a la mezcla de compuestos volátiles y no volátiles producto de reacciones bioquímicas como la proteólisis, lipólisis y glicólisis (Khatab *et al.*, 2019). En la proteólisis se liberan péptidos hidrofóbicos que se asocian al sabor amargo, y también se liberan aminoácidos que contribuyen al sabor dulce (Ala, Gly, Ser, Thr, Lys y Pro), ácido (Asp, Glu y Asn), amargo (His, Met, Val, Arg, Phe, etc.) y umami (glutamato y aspartato de sodio) en el queso (Fox *et al.*, 2017).

Análisis de perfil de textura (APT)

El sabor y la textura del queso se ven afectados a medida que avanza la maduración, los resultados del análisis de varianza indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la interacción queso-tiempo de maduración para los parámetros dureza, adhesividad, elasticidad y masticabilidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dureza, adhesividad, elasticidad y masticabilidad del queso añejo de Zacazonapan con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la interacción de factores queso y tiempo de maduración.

Table 2. Hardness, adhesiveness elasticity and chewiness of añejo Zacazonapan cheese with significant difference ($p \leq 0.05$) for interaction of cheese and ripening time factors.

Parámetro	Queso	Tiempo de maduración (d)			
		0	30	95	180
Dureza (N)	A	1.47 \pm 0.35d ^{xw}	2.61 \pm 0.35cx	6.78 \pm 0.35bx	11.13 \pm 0.28ax
	B	1.33 \pm 0.35dx	2.47 \pm 0.35cx	6.85 \pm 0.35bx	8.82 \pm 0.35ay
Adhesividad (N-s)	A	-0.02 \pm 0.02cx	-0.10 \pm 0.02bx	-0.22 \pm 0.01ax	-0.22 \pm 0.01ax
	B	-0.005 \pm 0.02ax	-0.03 \pm 0.02ay	-0.04 \pm 0.02ay	-0.01 \pm 0.02ay
Elasticidad	A	0.23 \pm 0.05cx	0.40 \pm 0.05bx	0.49 \pm 0.05abx	0.63 \pm 0.05ax
	B	0.50 \pm 0.05ay	0.54 \pm 0.05ax	0.45 \pm 0.05ax	0.48 \pm 0.05ax
Masticabilidad	A	0.26 \pm 0.11cx	0.42 \pm 0.11bx	1.27 \pm 0.11abx	1.42 \pm 0.11ax
	B	0.28 \pm 0.11ay	0.34 \pm 0.11ax	0.44 \pm 0.11ax	0.48 \pm 0.11ax

^wMedias \pm error estándar seguidas con distinta letra (a, b, c, d) en fila indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$).

^xMeans \pm standard error with different letters (a, b, c, d) in a row indicate statistical difference between cheeses (DMS, $p \leq 0.05$).

La mayor dureza se alcanzó a los 180 d, siendo de 8.82 N para el queso B y de 11.13 N para el queso A. Estos quesos se caracterizaron por un menor contenido de humedad y mayor contenido de proteína, lo cual se asocia con una microestructura de las redes proteicas más ramificada, más densa y con mayor grado de reticulación (Enab y Abd, 2012). Este incremento en la dureza fue observado en el queso Tulum, a los dos primeros días de maduración presentó una fuerza de 1456.35 N, la cual aumentó a 3303.64 N, a los 90 d (Tomar *et al.*, 2020). A diferencia del queso Cheddar, en el cual la dureza disminuyó de 15.69 a 8.15 N en un tiempo de 90 d, debido a las condiciones y características de su proceso, por ejemplo, una humedad adecuada permite que el agua se una a la red de caseína y mantenga una buena textura en el queso tipo Cheddar, si la humedad es alta causaría una disminución de la viscosidad y la dureza del queso (Hickey *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

La adhesividad fue mayor en el queso A con - 0.22 N-s a los 95 y 180 d de maduración, mientras que el queso B no presentó diferencia significativa durante el transcurso de la maduración. Por otra parte, la elasticidad del queso A fue de 0.23 al inicio de la maduración e incremento 0.4 unidades a los 180 d (0.63). Otra variable textural importante para el consumidor es la masticabilidad (Lamichhane *et al.*, 2018), en la cual ambos quesos presentaron un aumento al concluir los 180 d de maduración, siendo de 1.42 y 0.48 para los quesos A y B, respectivamente. Hernández-Morales *et al.* (2010) relacionan valores menores en elasticidad, dureza y masticabilidad con un alto contenido de grasa en quesos de Zacazonapan con 23 a 27 d de maduración.

Respecto a la cohesividad, el análisis estadístico señaló diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para los factores queso y tiempo de maduración. La mayor cohesividad se observó en el queso A (0.32 N), mientras que al finalizar la maduración este atributo sensorial decreció 0.28 unidades respecto al tiempo 0 (Cuadro 3). Este comportamiento fue observado en queso Cheddar de dos años, el cual presentó menor cohesi-

Cuadro 3. Cohesividad del queso añejo de Zacazonapan con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para los factores queso y tiempo de maduración.

Table 3. Cohesiveness of añejo Zacazonapan cheese with a significant difference ($p \leq 0.05$) for cheese and ripening time factors.

Variable respuesta	Queso	
	A	B
Cohesividad	0.32±0.013a	0.20±0.014b
Medias ± error estándar con distinta letra (a, b) en fila indican diferencia estadística entre quesos (DMS, $p \leq 0.05$). Means ± standard error with different letters (a, b) in a row indicate statistical difference between cheeses (DMS, $p \leq 0.05$).		
Tiempo de maduración (d)	Cohesividad	
0	0.43 ± 0.02a	
30	0.28 ± 0.02b	
95	0.19 ± 0.02c	
180	0.15 ± 0.02c	
Medias ± error estándar con distinta letra (a, b, c) en columna indican diferencia estadística entre tiempos (DMS, $p \leq 0.05$). Means ± standard error with different letters (a, b, c) in column indicate statistical difference between times (DMS, $p \leq 0.05$).		

vidad y elasticidad comparado con un queso Cheddar fresco, que exhibió mayor cohesividad y elasticidad, mediante determinaciones reológicas (Lamothe *et al.*, 2012). En suma, el proceso de elaboración de un queso afecta las características sensoriales (aroma y sabor) y texturales del mismo (Aguilar-Toalá *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

El queso añejo de Zacazonapan mostró cambios fisicoquímicos durante los 180 d de maduración, los cuales se relacionan con los principales componentes del queso (humedad, proteína y grasa). El incremento en la cantidad de proteína soluble en los extractos acuosos del queso y el porcentaje de grado de hidrólisis, son evidencia de la proteólisis llevada a cabo en el periodo de maduración. Este proceso bioquímico generó péptidos con la capacidad de donar electrones al radical libre DPPH o átomos de hidrógeno a los radicales peroxilo (ROO·), haciéndolos moléculas estables y menos perjudiciales (ruptura de la reacción en cadena del radical) para las biomoléculas. Cabe destacar, que este es el primer reporte de péptidos con actividad antioxidante en el queso añejo de Zacazonapan.

Por otra parte, el perfil flash permitió diferenciar entre quesos frescos (0 d) y madurados (180 d) con base en los atributos consensuados por el grupo de panelistas. En este sentido, los atributos sensoriales que describieron al queso añejo de Zacazonapan con 180 d de maduración fueron sabor residual amargo, olor a pies, firmeza o dureza, pungencia o picor, sabor a queso madurado y apariencia porosa. Además, estos quesos presentaron mayor dureza y masticabilidad que los quesos frescos.

La información generada en la presente investigación permitió describir al queso añejo de Zacazonapan desde un ámbito fisicoquímico, bioactivo, sensorial y textural. Este conocimiento abre la posibilidad a los productores para mejorar su proceso de elaboración, resaltar las características sensoriales y el potencial bioactivo de su producto. Así mismo, esta información contribuye a la tipicidad y revalorización del queso, lo cual podría impactar de manera positiva a la cadena agroalimentaria que este sustenta, y a su vez al desarrollo económico rural y regional.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Dirección General de Investigación y Posgrado. Además del apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, a las autoridades y pobladores del Municipio de Zacazonapan por su contribución al desarrollo del trabajo de campo.

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27(6): 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>

- Aguilar-Toalá, J.E., Torres-Llenez, M.J., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. and González-Córdova, A.F. 2022. Antioxidant capacity and identification of radical scavenging peptides from Crema de Chiapas, Fresco and Cocido cheeses. *Journal of Food Science and Technology*. 59(7): 2705-2713. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05291-2>
- Alonzo-Paz, A.L., Lugo-Cervantes, E.C., Tovar-Pérez, E.G. and Chombo-Morales, M.P. 2016. Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región de origen MC asociado al tiempo de maduración. En *Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ*.
- Álvarez, R.L., Arrieta, B.D., Dávila, O.G., Ruiz, R.J.C. and Toledo, L.V.M. 2022. Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. *Food Chemistry*. 14: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100284>
- Banihashemi, S.A., Nikoo, M., Ghasempour, Z. and Ehsani, A. 2020. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 29 (101798): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>
- Baptista, D.P. and Gigante, M.L. 2021. Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101(10): 4010-4017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Dairou, V. and Sieffermann, J. M. 2002. A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the Flash Profile. *Journal of Food Science*. 67(2): 826-834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. and Bartolomé, B. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(1): 48-54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Dias da Silva, D., de Lima, M.D.S.F., da Silva, Fernandes da Silva, M., da Silva G.R., Campos, J.F., Campos A.W.W., Holanda, M.T. and Figueiredo, P.A.L. 2019. Bioactive water-soluble peptides from fresh buffalo cheese may be used as product markers. *LWT-Food Science and Technology*. 108: 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.035>
- Domingues, G.B., Parra, B.D., Giacometti, C.F. y Lúcia, G.M. 2019. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *LWT-Food Science and Technology*. 107: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Enab, A.K., Hassan, F.A.M. and Abd, M.A.M.G.E. 2012. Effect of manufacture steps on cheese structure (review). *International Journal of Academic Research*. 4(6): 79-89. <https://doi.org/10.7813/2075-4124.2012/4-6/a.11>
- Espinosa-Pesqueira, D., Hernández-Herrero, M.M. and Roig-Sagués, A.X. 2018. High hydrostatic pressure as a tool to reduce formation of biogenic amines in artisanal Spanish cheeses. *Foods*. 7(9): 137. <https://doi.org/10.3390/foods7090137>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H. 2017. *Fundamentals of Cheese Science*. 2 nd. ed. Springer, New York, NY.
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-Castillo, M., Picque, D., Spinnler, H.E. and Martín del Campo, S.T. 2017. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture: a preliminary study. *CyTA - Journal of Food*. 15: 49-57. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1202325>
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. and Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 588-593. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E. and Villegas, A. 2010. Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 63: 552-560. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00615.x>
- Kariyawasam, K.M.G.M.M., Jeewanthi, R.K.C., Lee, N.K. and Paik, H.D. 2019. Characterization of cottage cheese using *Weissella cibaria* D30: Physicochemical, antioxidant, and antilisterial properties. *Journal of Dairy Science*. 102(5): 3887-3893. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15360>
- Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M. and Jaspal, M.H. 2019. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*. 18(1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Khattab, A.R., Guirguis, H.A., Tawfik, S.M. and Farag, M.A. 2019. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*. 88: 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Lamichhane, P., Kelly, A.L. and Sheehan, J.J. 2018. Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *Journal of Dairy Science*. 101(3): 2692-2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>
- Lamothe, S., Corbeil, M.M., Turgeon, S.L. and Britten, M. 2012. Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food and Function*. 3(7): 724-731. <https://doi.org/10.1039/c2fo10256k>
- López-Villafaña, B.P., Rojas-González, S., Elías-Román, R.D. and Rodríguez-Hernández, G. 2023. The evolution of antioxidative properties of protein-derived peptides of Mexican Panela goat and cow milk cheese during its shelf life. *CyTA - Journal of Food*. 21(1): 57-63. <https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2152100>
- Matar, C., Amiot, J., Savoie, L. and Goulet, J. 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *Journal of Dairy Science*. 79(6): 971-979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76448-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76448-2)
- Manzo, N., Santini, A., Pizzolongo, F., Aiello, A., Marrazzo, A., Meca, G., Durazzo, A., Lucarini, M. and Romano, R. 2019. Influence of ripening on chemical characteristics of a traditional Italian cheese: Provolone del Monaco. *Sustainability*. 11(9): 2520. <https://doi.org/10.3390/su11092520>

- McSweeney, P.L.H. and Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80: 293-324.
- Öztürk, H.İ. and Akin N. 2021a. Effect of ripening time on peptide dynamics and bioactive peptide composition in Tulum cheese. *Journal of Dairy Science*. 104(4): 3832-3852. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19494>.
- Öztürk, H.İ., Konak, G.C. and Akin N. 2021b. Proteolysis pattern and functional peptides in artisanal Tulum cheeses produced from Mut province in Turkey. *LWT-Food Science and Technology*. 149: 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111642>.
- Öztürk, H.İ. and Akin, N. 2018. Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*. 38: 674-682. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.11917>
- Pritchard, S.R., Phillips, M. and Kailasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*. 43 (5): 1545-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rafiq, S., Gulzar, N., Sameen, A., Huma, N., Hayat, I. and Ijaz, R. 2021. Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 74(1). 1-16.
- Rahman, M.S., Al-Attabi, Z.H., Al-Habsi, N. and Al-Khusaibi, M. 2021. Measurement of Instrumental Texture Profile Analysis (TPA) of Foods. In: Khan, M.S., Rahman, M.S. (eds) *Techniques to Measure Food Safety and Quality*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_17
- Ruvalcaba-Gómez, J.M., Ruiz-Espinosa, H., Arteaga-Garibay, R.I., Rojas-López, M., Amador-Espejo, G.G., Anaya-Esparza, L.M. and Delgado-Macuil, R.J. 2020. Texture, physicochemical and sensory properties of artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco, a genuine Mexican cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 70: 1-10. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12676>
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J.E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Córdoba, B., Liceaga, A.M. and González-Córdova, A.F. 2018. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3742-3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31: 1949-1956. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12732>
- Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., Hassan, F. U. and Fathy, D. 2020. The multifunctional activity of water-soluble peptides' extract of Domiati cheese during accelerated ripening by Neutrase. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44(5): e14434. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14434>
- Tekin, A. and Hayaloglu, A.A. 2022. Understanding the mechanism of ripening biochemistry and flavour development in brine ripened cheeses. *International Dairy Journal*. 137: 105508. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105508>
- Timón, M.L., Andres, A.I., Otte, J. and Petró, M.J. 2019. Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*. 120: 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.019>
- Tomar, O., Akarca, G., Gök, V. and Çağlar, Y. 2020. The effects of packaging materials on the fatty acid composition, organic acid content, and texture profiles of Tulum cheese. *Journal of Food Science*. 85(10): 3134-3140. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15404>
- Torres-Salas, V. and Hernández-Montes, A. 2021a. Los valores humanos en el consumo del queso añejo de Zacazonapan. *Nova Scientia*. 13(26). <https://doi.org/10.21640/ns.v13i26.2826>
- Torres-Salas, V. and Hernández-Montes, A. 2021b. Respuestas emocionales en consumidores de Queso de Zacazonapan y probabilidad de consumo durante maduración. *Agrociencia*. 55(3): 243-259.
- Torres-Salas, V., Hernández-Montes, A., Pablo-Cano, M., Jáuregui-García, C.Z., Peralta-Aparicio, C. and Espejel-García, A. 2020. Comunalidades de significados para quesos tradicionales mexicanos: queso de Zacazonapan, Quesillo y queso de Poro. *Acta universitaria*. 30: 1-13. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2875>
- Torres-Salas, V., Hernández-Rodríguez, B.E., Hernández-Montes, A., Castillo, E., Zuleta-Prada, H. and Herbert-Pucheta, J.E. 2021. Solid-state NMR spectroscopy for disentangling structural and motional features of lyophilized ripened cheese water-soluble extracts related to antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 334: 127603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127603>
- Turan, N. and Durak, M.Z. 2022. The identification of antioxidant and ACE-I peptides in different turkish ripened cheeses. *Journal of Food Science and Technology*. 59(8): 3274-3282. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05414-3>
- Villegas, D.G.A. 2004. *Tecnología quesera*. México. Trillas.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. del M. and Millán, F. 2001. Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*. 52: 132-136.
- Yang, W., Hao, X., Zhang, X., Zhang, G., Li, X., Liu, L. Sun, Y. and Pan, Y. 2021. Identification of antioxidant peptides from cheddar cheese made with *Lactobacillus helveticus*. *LWT - Food Science and Technology*. 141: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110866>
- Zhao, X., Zheng, Z., Zhang, J., Sarwar, A., Aziz, T. and Yang, Z. 2019. Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine. *Food Science Nutrition*. 7(4): 1540-1550. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1003>